



Dynamique de la jonction adhérente : rôle d'EPLIN dans la stabilité des contacts intercellulaires de l'endothélium vasculaire

Adeline Pétinot

► To cite this version:

Adeline Pétinot. Dynamique de la jonction adhérente : rôle d'EPLIN dans la stabilité des contacts intercellulaires de l'endothélium vasculaire. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GREN050 . tel-00650170

HAL Id: tel-00650170

<https://theses.hal.science/tel-00650170>

Submitted on 9 Dec 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Adeline/CHERVIN-PETINOT** »

Thèse dirigée par « **Danielle/GULINO** » et

préparée au sein du **Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection**

dans l'**École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

Dynamique de la jonction adhérente : Rôle d'EPLIN dans la stabilité des contacts intercellulaires de l'endothelium vasculaire

Thèse soutenue publiquement le « **7 octobre 2011** »,
devant le jury composé de :

Mme, Danielle, GULINO

DR2 CNRS Grenoble, rôle (Membre)

Mme, Sylvie, Dufour

DR2 CNRS Paris, (Rapporteur)

Mme, Pascale, DUFOURCQ

Professeur des Universités Bordeaux II, (Rapporteur)

Mr, Philippe, HUBER

DR CEA Grenoble, (Président)



Remerciements

Mes remerciements se tournent vers tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à aller au bout de ces quatre années de thèse.

Merci à Danielle et Philippe qui m'ont accueilli respectivement dans leur laboratoire et leur équipe.

Merci aux filles du labo et elles sont nombreuses !!! Pour toutes les pauses café, les joies, les coups de gueule, les déprimés, les sorties, les apéros, balade à cheval, barbecue, anniversaires, sorties raquettes... Celles de passage pour une thèse, un post-doc, un CDD, un CDI :

Alice, merci pour avoir partagé tant de bons moments mais aussi nos tristesses et je sais que nous continuerons sur Voiron encore et toujours.

Tiphaine, merci pour ta pétillance légendaire qui nous donnait la pêche.

Stéphanie R, merci pour ta bonne humeur, toutes ces recettes et anecdotes sur tes loulous.

Marion, je me demande encore comment tu fais pour mener une double vie, tu es une bouffée d'air frais venue de Theys.

Emilie, je t'aurais bien gardé un peu plus longtemps à mes côtés mais je suis très heureuse de te savoir dans ta vie parisienne mariée et maman, merci d'avoir fait le déplacement pour ma soutenance.

Mariela, merci pour tous les moments que nous avons partagé dans le même bureau

Mélanie, dans les dernières arrivées tu as su mettre de l'ambiance et nous refiler tous tes bons plans. Je te souhaite de trouver le poste de tes rêves.

Stéphanie H, merci pour les premiers mots que tu m'as dit. Je ne les ai compris que plus tard.

Merci à mon club de soutien et coups de pieds au derrière pour que j'aille au bout de cette thèse !!!

Marie-Hélène, un grand merci pour tous tes conseils avisés côté manips, cuisine et vie personnelle. Je te souhaite de continuer à profiter de la vie comme tu le fais déjà si bien.

Marie, qu'aurais-je fait sans toi si tu n'étais pas venue parmi nous ? Merci de tout le travail accompli pour que je puisse avancer. Merci d'avoir accueilli avec autant de joie la nouvelle de ma grossesse et de m'avoir permis de continuer les manips. Je sais qu'on restera en contact.

Emma, tu es celle qui m'a le plus boosté et mis des coups de pieds au derrière pour que j'avance. Merci de ta sincérité et ta franchise qui m'ont permis à plusieurs reprises de me remettre en question.

Anne-Sophie, un grand merci pour toutes nos discussions sur des sujets bien divers et pour tes encouragements. Bonne continuation dans ton nouveau labo.

Stéphanie B, en quelques mots, merci pour tout. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. Merci pour toutes nos discussions (scientifique, maison, cuisine, jardin...). Tu as su m'encourager et dire les mots justes pour que je persévère. Que tes projets soient nombreux et portent leurs fruits.

Merci à l'équipe du LTM : Alice, Abbas et Michel. Alice, un grand merci de ton investissement et de ton dynamisme à mes côtés.

Merci aussi à : Adama, Wassim, Zeinab, Eric, Francine, Muriel, Blaise, Boubacar, Sébastien, Josianne, Emilie Planes, Tzety et tous ceux que j'aurais pu oublier

J'ai également beaucoup de reconnaissance envers ma famille et belle-famille qui m'a toujours encouragé dans mes projets et ils ont été nombreux aux cours de ces quatre années (thèse, mariage, maison et Emmanuel).

Sylvain, tu es l'un des piliers de ma vie. Merci de ton soutien sans faille.

Emmanuel, tu es ma plus belle expérience...

Certaines vérités exigent parfois qu'on reste dans le droit chemin, mais les voies de la connaissance scientifique sont aussi tortueuses et complexes que l'esprit humain.

Citation de Stephen Jay Gould

Quand les poules auront des dents: réflexions sur l'histoire naturelle (1983)

Résumé

Dynamique de la jonction adhérente :

Rôle d'EPLIN dans la stabilité des contacts intercellulaires de l'endothélium vasculaire

L'adhérence cellule/cellule est initiée dans l'endothélium vasculaire par des interactions homophiliques entre molécules de VE-cadhérine (= jonctions adhérentes). La dynamique de la jonction et du cytosquelette est importante pour le remodelage des jonctions intercellulaires qui a lieu au cours l'angiogenèse, de la vasculogenèse et lors de la réparation de l'endothélium. D'après la littérature, la protéine EPLIN intervient dans la formation du complexe E-cadhérine/alpha-caténine/EPLIN et stabilise l'actine corticale. Actuellement décrite comme spécifique des modèles épithéliaux, EPLIN peut-elle intervenir dans la liaison du complexe à base de VE-cadhérine au cytosquelette d'actine? Ce travail montre pour la première fois qu'EPLIN s'exprime à des niveaux similaires dans l'endothélium et l'épithélium. Nos expériences ont contribué à établir qu'EPLIN interagit avec l' α -caténine au sein du complexe VE-cadhérine/caténines suggérant un nouveau mode d'ancrage du complexe à base de VE-cadhérine au cytosquelette d'actine. Des tests fonctionnels réalisés en présence et en absence d'EPLIN ont souligné le rôle d'EPLIN dans l'endothélium notamment au cours des processus de néovascularisation. Même si les mécanismes qui permettent à EPLIN de favoriser la formation de structures pseudovasculaires restent encore imprécis, il sera possible, à l'avenir, d'utiliser de nouvelles approches élaborées conjointement avec des physiciens et des chimistes pour aborder cette problématique sous un angle mécanique.

Mots clés : Jonction adhérente, VE-cadhérine, EPLIN, Actine.

Abstract

Dynamic of adherens junction :

EPLINs' role in stabilization of intercellular contacts in the vascular endothelium

In vascular endothelium, cell/cell adhesion is mediated by homophilic interactions of VE-cadherin molecules (= adherens junctions). Cytoskeleton and junction dynamics are important for intercellular junctions remodelling that occurs during angiogenesis, vasculogenesis and endothelium repair. We learn from the literature that EPLIN is involved in E-cadherin/ α -catenin/actin complex formation and cortical actin stabilization. Usually described as a protein specific of epithelial models, we wondered if EPLIN is able to link VE-cadherin complex to actin cytoskeleton. Our data showed for the first time that EPLIN is expressed at similar level in epithelial and endothelial cells. Our experiments contributed to establish that EPLIN interact with α -catenin in the VE-cadherin/catenins complex suggesting a new way to anchor the actin cytoskeleton to VE-cadherin complex. Functional tests, with cells expressing EPLIN or not, highlighted the contribution of EPLIN to neovascularization. While the mechanisms, by which EPLIN favors pseudovascular structures formation, remain unknown, it will be possible, in the future, to employ new approaches, developed by physicists and chemists, to address this issue from a mechanical point of view.

Key words: Adherens junction, VE-cadherin, EPLIN, Actin.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
Liste des abréviations	5
Liste des figures et tableaux	9
INTRODUCTION.....	11
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. Biologie des vaisseaux	17
A. Physiologie du système vasculaire : anatomie des vaisseaux	17
1. Le système artériel	18
2. Le système veineux	18
3. Les capillaires.....	18
4. Le système lymphatique.....	19
B. Formation du système vasculaire	19
1. Vasculogénèse	20
2. Angiogénèse	21
a. Mécanisme d'angiogénèse par bourgeonnement.....	22
b. Mécanisme d'angiogénèse par intussusception.....	25
3. Angiogénèse physiologique et pathologique.....	26
C. Cohérence de l'endothélium vasculaire.....	29
1. Généralités sur l'endothélium vasculaire	29
2. Les jonctions serrées	30
a. Structure et fonction	30
b. Principaux composants membranaires des jonctions serrées	31
3. Les jonctions communicantes	34
4. Les jonctions d'ancrage.....	36
a. Les jonctions adhérentes.....	36
b. Les desmosomes.....	37
II. Architecture moléculaire de la jonction adhérente interendothéliale	39
A. Généralités sur les cadhérines	39
1. Classification des cadhérines	39
a. Les cadhérines classiques de type I et II	39
b. Les cadhérines desmosomales.....	40

c. Les protocadhérines	40
d. Les cadhérines non conventionnelles	41
2. Les principales cadhérines endothéliales	42
a. La VE-cadhérine	42
b. La N-cadhérine	42
c. La protocadhérine 12	43
B. La VE-cadhérine : un acteur majeur de la jonction adhérente interendothéliale.....	44
1. Structure de la molécule et assemblage.....	44
a. Mise en évidence et structure	44
b. Assemblage des molécules de VE-cadhérine	45
2. Fonctions associées à la VE-cadhérine	46
a. Régulation de la perméabilité vasculaire.....	46
b. Régulation de la morphogénèse	49
c. Inhibition de contact et prolifération cellulaire	50
d. Modulation de la survie cellulaire	53
C. Les caténines : un partenariat avec la VE-cadhérine	55
1. La β -caténine	55
2. La γ -caténine (ou plakoglobine).....	57
3. La p120-caténine	58
4. L' α -caténine	59
D. Le cytosquelette.....	60
1. Les différents composants du cytosquelette.....	61
a. Les microtubules	61
b. Les filaments intermédiaires	65
c. Les filaments d'actine.....	67
2. Zoom sur le cytosquelette d'actine.....	68
a. Dynamique du cytosquelette d'actine	68
b. Les différentes fonctions du cytosquelette d'actine	71
c. Coopération actine/Rho GTPases	75
III. Une approche dynamique de la jonction interendothéliale	81
A. Une idée émergente : sensibilité des jonctions intracellulaires à la mécano-transduction	81
1. Définition	81
2. Généralités.....	81

3. Substrats microstructurés pour l'étude des forces engagées par les cellules	84
B. La connexion cytosquelette / jonctions adhérentes	86
1. Un débat d'actualité	86
2. Cytosquelette/VE-cadhérine : une relation de haute importance	88
3. Quelques acteurs de cette connexion	89
a. L'annexine A2	89
b. La myosine X	90
c. Les autres partenaires	92
RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION	95
I. EPLIN à l'interface entre complexe adhérent et cytosquelette d'actine	97
A. Contexte de l'étude	97
1. Bref historique de la protéine	97
2. Structure d'EPLIN	99
3. Implication d'EPLIN dans la dynamique des contacts intercellulaires et l'angiogenèse	100
B. Principaux résultats: article	100
C. Discussion	137
II. Etude des forces engagées par l'endothélium	140
A. Description du projet	140
B. Contexte scientifique et technique	141
1. Données bibliographiques	141
a. Lien entre adhérences cellule/matrice et adhérences intercellulaires	141
b. Technologies de mesure des forces intercellulaires	142
2. Objectifs du travail	145
3. Développement technologique et méthodes utilisées	146
a. Gels de polyacrylamide de rigidité contrôlée	146
b. Substrats en PDMS microstructurés	147
4. Résultats préliminaires	149
a. Influence de la rigidité matricielle sur les adhérences intercellulaires	149
b. Détermination de la contractilité d'une monocouche	153
5. Perspectives du projet	155
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	158
Bibliographie	166

LISTE DES ABBREVIATIONS

3D : 3 dimensions
ABP : Actin Binding Protein
ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase
ADF : Actin Depolymerizing Factor
ADN : Acide DéoxyriboNucléique
ADP : Adénosine DiPhosphate
AFM : Atomic Force Microscopy
Ang : Angiopoïétine
APC : Adenomatous Polyposis Coli
ARN : Acide RiboNucléique
Arp : Actin-Related Protein
ARPC : Actin Related Protein Complex
ATP : Adénosine TriPhosphate
BCL9 : B-Cell Lymphoma 9
CAM : ChorioAllantoic Membrane
CBD : Catenin-Binding Domain
CCM : Cerebral Cavernous Malformation
CFP : Cyan Fluorescent Protein
CHO : Chinese Hamster Ovary
CKI : Casein Kinase 1
CLMP : Coxsackie- and adenovirus receptor-Like Membrane Protein
CMP : Cartilage Matrice Protein
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
Csk : C-terminal Src Kinase
Cx : Connexine
Da : Dalton
DEP1 : Density Enhance Phosphatase 1
DMP1 : Dentin Matrix Protein 1
Dsh : Dishevelled
dpc : days postcoitum
EC : ExtraCellular
E-cadherin : Epithelial-Cadherin
EPLIN : Epithelial Protein Lost in Neoplasm
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ERM : Ezrin/Radixin/Moesin
ESAM : Endothelial Cell Adhesion Molecule
FAK : Focal Adhesion Kinase
FERM : Four point one (4.1)/Ezrin/Radixin/ Moesin
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGF-R : Fibroblast Growth Factor Receptor
FH : Formin Homology
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRP : Frizzled Related Protein
Fzd : Frizzled
GAPs : GTPase Activating Proteins
Gas 1 : Growth arrest-specific 1
GDI : Guanine nucleotide Exchange Inhibitor

GDP : *Guanosine DiPhosphate*
GEF : *Guanine nucleotide Exchange Factor*
GFP : *Green Fluorescent Protein*
GPI : *Glycosyl-PhosphatidylInositol*
GSK : *Glycogene Synthase Kinase*
GST : *Glutathione S-Transferase*
GTP : *Guanosine TriPhosphate*
HB-EGF : *Heparin-Binding-Epidermal Growth Factor*
HECV : *Human Endothelial Cord Vein*
HEK293 : *Human Embryonal Kidney 293*
HEV : *High Endothelial Venules*
HSP : *Heat Shock Protein*
HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*
IAP : *Inhibitor Apoptosis Protein*
IAR : *Intussusceptive ARborisation*
IBR : *Intussusceptive Branching Remodeling*
ICAM : *Intercellular Adhesion Molecule*
Ig : *Immunoglobuline*
IMG : *Intussusceptive Microvascular Growth*
JAM : *Junctional Adhesion Molecule*
JEAP : *Junction-Enriched and Associated Protein*
JMD : *JuxtaMembrane Domain*
KO : *Knock Out*
KD : *Knock Down*
LEF : *Lymphocyte-Enhancing Factor*
LTM : *Laboratoire des Technologies pour la Microélectronique*
MAGUKs : *Membrane-Associated GUanylate Kinase)*
MAL : *Megakaryoblastic Acute Leukemia*
MAP : *Microtubule Associated Proteins*
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MDCK : *Madin-Darby Canine Kidney*
MEC : *Matrice ExtraCellulaire*
MEF2C : *Myocyte Enhancer binding Factor 2C*
MLC : *Myosin Light Chain*
MLCP : *Myosin Light Chain Phosphatase*
MMP : *Matrix MetalloProteinase*
MRTF : *Myocardin-Related Transcription Factor*
MUPP1 : *Multi-PDZ Protein 1*
MYPT1 : *MYosin Phosphatase Targeting subunit 1*
MyTH4 : *Myosin Tail Homology 4*
N-cadherin : *Neural-cadherin*
NFkB : *Nuclear Factor-KappaB*
NK : *Natural Killer*
nN : *nanoNewton*
NO : *Nitric Oxyde*
Pa : *Pascal*
PATJ : *PALS1-Associated Tight Junction protein*
P-cadherin : *Placental-cadherin*
PCDH12 : *ProtoCaDHerin 12*
PDGF-BB : *Platelet Derived Growth Factor-BB*

PDMS : *PolyDiMethylSiloxane*
PDZ : *Post-synaptic Disc-large Zonula*
PECAM : *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*
PH : *Plekstrin Homology*
PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*
PKA : *Protein Kinase A*
PKC : *Proteine Kinase C*
PIGF : *Placental Growth Factor*
PLL-PEG : *Poly(L-Lysine)-Poly(Ethylene Glycol)*
pN : *picoNewton*
PYK 2 : *Proline-rich tyrosine (Y) Kinase*
R-cadherin : *Retinal-cadherin*
Rho GDI : *Rho GDP Dissociation Inhibitor*
ROCK : *Rho Kinase*
SFK : *Src Family Kinase*
SHP : *Src homology phosphatase*
Src : *Sarcoma*
SRF : *Serum Response Factor*
Sulfo-SANPAH : *N-SulfoSuccinimidyl-6-[4'-Azido-2'-NitroPhenylAmino] Hexanoate*
TCF : *T Cell Factor*
TGF : *Transforming Growth Factor*
Thr : *Thréonine*
VAMP : *Vesicle-Associated Membrane Protein*
VAP-33 : *VAMP-Associated Protein*
VE-cadherin : *Vascular Endothelial-cadherin*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*
VE-PTP : *Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase*
VH : *Vinculin Homolog*
VVO : *VesiculoVacuolar organelles*
vWF : *von Willebrand Factor*
WASP : *Wiscott-Aldrich Syndrome Protein*
WAVE : *WASP-family VErproulin-homologous protein*
YFP : *Yellow Fluorescent Protein*
ZO : *Zonula Ocludens*

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe de vaisseau sanguin	17
Figure 2 : Formation du système vasculaire : vasculogenèse et angiogenèse	20
Figure 3 : Les différents types d'angiogenèse	22
Figure 4 : Mécanisme d'angiogenèse par bourgeonnement	23
Figure 5 : Représentation tri-dimensionnelle du processus d'angiogenèse par intussusception	25
Figure 6 : Stratégies d'inhibition de la voie de signalisation du VEGF	28
Figure 7 : Composition moléculaire des jonctions serrées	30
Figure 8 : Représentation schématique des jonctions communicantes	35
Figure 9 : Représentation schématique d'une jonction adhérente	37
Figure 10 : Structure des desmosomes	38
Figure 11 : Structures des différents membres de la superfamille des cadhérines	41
Figure 12 : Deux modèles d'assemblage des molécules de VE-cadhérine	46
Figure 13 : Phosphorylation de la VE-cadhérine : sites spécifiques et voies de signalisation	47
Figure 14 : Implication de la VE-cadhérine dans la morphogenèse vasculaire	50
Figure 15 : Modulation de la prolifération cellulaire par le VEGF	52
Figure 16 : Modulation de la survie cellulaire régie par la VE-cadhérine	54
Figure 17 : Rôle de la β -caténine dans la signalisation Wnt	56
Figure 18 : Modèles de coopération entre cadhérines et cytosquelette d'actine régit par l' α -caténine	60
Figure 19 : Structure et dynamique des microtubules	62
Figure 20 : Organisation des microtubules	63
Figure 21 : Distribution subcellulaire des filaments intermédiaires	66
Figure 22 : Dynamique du cytosquelette d'actine	69
Figure 23 : Organisation des filaments d'actine dans différentes régions de la cellule	73
Figure 24 : Mécanismes à la base de la contractilité cellulaire ou complexe actomyosine	75
Figure 25 : Cycle des Rho-GTPases	76
Figure 26 : Contribution des GTPases de la famille Rho à la dynamique du cytosquelette d'actine	77
Figure 27 : Contraction actomyosine dépendant de Rho	79
Figure 28 : Modèle d'activation de l' α -caténine par les forces mécaniques	83
Figure 29 : Fabrication d'hydrogel pour la culture cellulaire	85
Figure 30 : Utilisation de surface microstructurées pour étudier les forces cellulaires	86
Figure 31 : Modèle décrivant la connexion entre cadhérines et cytosquelette d'actine	87
Figure 32 : Mécanisme potentiel de stabilisation de la VE-cadhérine par l'annexine A2	90
Figure 33 : Myosine X, structure et fonction	91
Figure 34 : Représentation schématique de la structure d'EPLIN	99
Figure 35 : Lien entre adhérence cellule/matrice et adhérence intercellulaire	142
Figure 36 : Méthode de mesure de la force de séparation	143
Figure 37 : Mesure des forces intercellulaires par AFM	144

Figure 38 : Principe de mesure de force de rupture entre ligand et récepteur sur cellule vivante.	145
Figure 39 : Principe de l'AFM.	146
Figure 40 : Géométrie des canaux.	147
Figure 41 : Fabrication des substrats en PDMS	148
Figure 42 : Comportement des HUVECs sur un substrat à double rigidité.	149
Figure 43 : Analyse des données de microscopie à force de traction	152
Figure 44 : Premiers essais de cultures d'HUVECs sur les canaux déformables	153
Figure 45 : Vue en 3 dimensions du positionnement d'une cellule HUVEC sur les piliers.	154
Figure 46 : Nouveau système de canaux déformables	155
Figure 47 : Modélisation du capteur de force.	155
Figure 48 : Connexions entre le complexe VE-cadhérine/caténines et le cytosquelette d'actine.	161
 Tableau 1 : Pathologies caractérisées ou causées par une angiogenèse anormale ou excessive.	 27

INTRODUCTION

Il y a quatre ans, le mot « endothélium » n'avait pas de sens pour moi. Et pourtant... L'endothélium n'est-il pas ce tissu si essentiel qu'il permette aux organes d'être approvisionnés en oxygène et en nutriments ? Devant le nombre de processus physiologiques (contrôle du passage des molécules dans et hors du flux sanguin, contrôle de la pression sanguine, coagulation et angiogenèse physiologique) et pathologiques (athérosclérose, angiogenèse tumorale ou encore inflammation) qui dépendent directement ou indirectement des fonctions de l'endothélium, on ne peut que souligner l'importance de connaître et d'étudier ce tissu.

L'intégrité et la cohésion de l'endothélium sont assurées par les jonctions cellule-cellule, les jonctions cellule-matrice extracellulaire mais également par l'ancrage de ces jonctions au cytosquelette. Au sein de notre équipe, nous nous intéressons plus particulièrement aux jonctions adhérentes qui permettent aux cellules de s'assembler entre elles pour former ce tapis de cellules jointives qu'est l'endothélium. La VE-cadhérine est l'artisan principal de cette cohésion tissulaire. Protéine transmembranaire, sa partie extracellulaire assure les liaisons homotypiques entre molécules de VE-cadhérine, sa partie intracellulaire, quant à elle, assure l'ancrage au cytosquelette. C'est sur ce dernier point, l'ancrage des jonctions adhérentes au cytosquelette d'actine, que j'ai travaillé durant ces quatre dernières années. Mon sujet de thèse s'est patiemment construit au grés de mes recherches et s'intitule aujourd'hui : « Dynamique de la jonction adhérente : Rôle d'EPLIN dans la stabilité des contacts intercellulaires de l'endothélium vasculaire ».

Ce manuscrit s'articule autour de trois parties complémentaires. La première partie vous emmènera dans une revue bibliographique qui pose les fondements théoriques nécessaires à l'introduction et à la compréhension du sujet. Vous y trouverez notamment un chapitre consacré au système vasculaire et à la biologie des vaisseaux, un chapitre qui s'intéresse aux différents acteurs moléculaires de l'architecture de la jonction adhérente et enfin un chapitre qui vous propose quelques éléments pour aborder la jonction interendothéliale comme un système dynamique. La seconde partie correspond au noyau dur de ma thèse, à savoir le fruit de ces années de recherche et d'expérimentation, valorisé notamment par la rédaction d'un article scientifique. Pour terminer, je vous propose quelques réflexions personnelles sur les conclusions et le devenir de ce travail de recherche dans une partie intitulée : Conclusions et perspectives. Enfin, dans un chapitre annexe, sera présenté un article, auquel j'ai participé, intitulé : « The motor protein Myosin-X transports VE-Cadherin along filopodia to allow the formation of early endothelial cell-cell contacts » et publié en 2010 dans *Molecular and Cellular Biology*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Biologie des vaisseaux

A. Physiologie du système vasculaire : anatomie des vaisseaux

Le système vasculaire, qui comprend les artères, les veines et les capillaires, a deux grands rôles à jouer dans l'organisme. D'une part, il assure à tous les tissus de l'organisme un apport continu en oxygène et en nutriments ainsi que l'évacuation du dioxyde de carbone et des déchets. D'autre part, il travaille en étroite collaboration avec le cœur pour maintenir un débit sanguin continu dans l'appareil circulatoire en lissant le flux sanguin pulsatile à la sortie du cœur.

La paroi des vaisseaux sanguins est schématiquement représentée comme la superposition de trois couches concentriques : l'intima, la média et l'adventice (: Représentation schématique d'une coupe de vaisseau sanguin **Figure 1**).

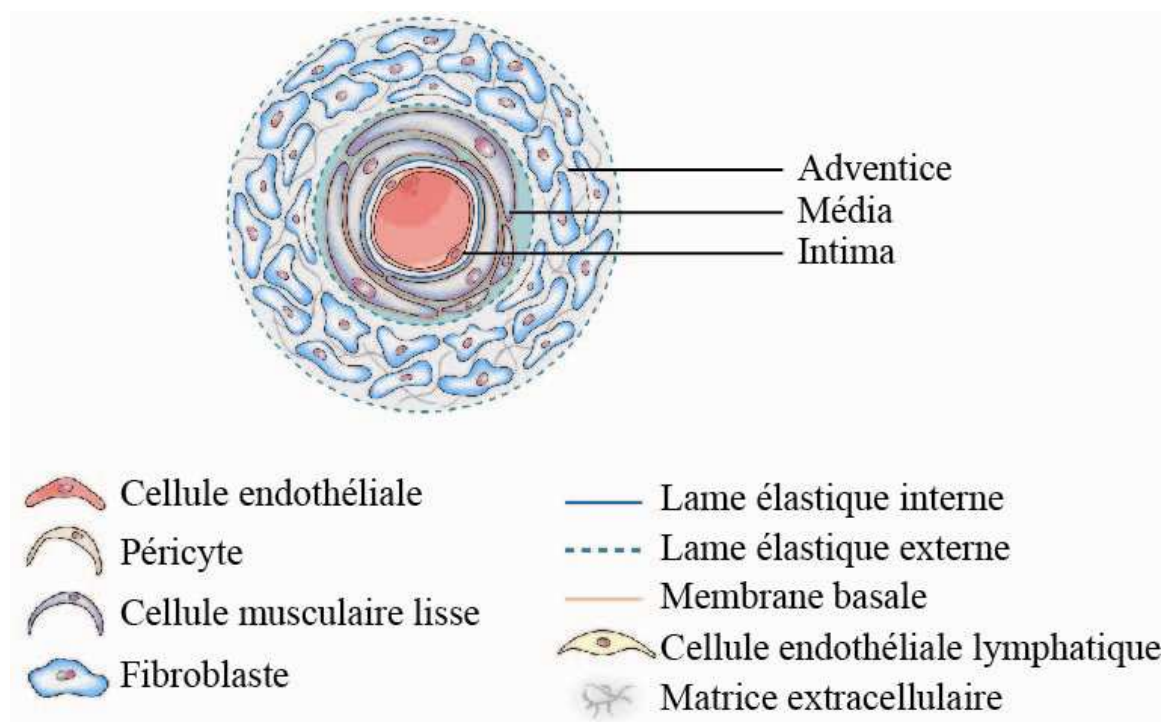


Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe de vaisseau sanguin

De manière générale, les vaisseaux sanguins de gros diamètre (veines et artères) sont constitués de trois couches (ou tuniques) successives : l'intima constitué de cellules endothéliales jointives et de cellules musculaires lisses, la média principalement constituée de cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses) et enfin l'adventice composé de tissu conjonctif et de fibroblastes. D'après (**Jain, 2003**).

L'intima, principalement constitué de l'endothélium, est l'épithélium de revêtement de toutes les parois vasculaires en contact direct avec le flux sanguin. La média est formée de cellules musculaires lisses et de constituants de la matrice extracellulaire, elle assure essentiellement les fonctions vasomotrices du vaisseau. L'adventice, quant à elle, est la couche la plus externe, elle est constituée de fibres élastiques et conjonctives et contient les éléments nerveux. Cette structure peut varier d'un type de vaisseaux à l'autre et confère aux artères, aux veines et aux capillaires des propriétés particulières.

1. Le système artériel

Le système artériel est constitué d'artères et d'artérioles. Son rôle est d'assurer la distribution du sang riche en oxygène à partir du cœur et jusqu'aux tissus. Les artères, proches du cœur, sont des vaisseaux de diamètre important qui contiennent des fibres élastiques qui permettent d'amortir les élévations de la pression systolique. Les artères se ramifient progressivement en artérioles, qui possèdent des diamètres plus petits permettant une meilleure pénétration au cœur des tissus. Les artérioles sont plus riches en fibres musculaires ce qui leur permet de lisser le flux sanguin afin qu'il soit continu à l'entrée des capillaires.

2. Le système veineux

Le système veineux est chargé de transporter le sang pauvre en oxygène et les déchets métaboliques des tissus vers le cœur. Pour diriger le flux sanguin des tissus vers le cœur, les veines possèdent un mécanisme anti-reflux qui empêche le sang de revenir en arrière. Ce mécanisme anti-reflux est constitué de nombreuses valvules qui imposent un sens de circulation. Le système veineux a également une fonction de réservoir sanguin et de régulation de la volémie. En conditions physiologiques ou pathologiques, les veines peuvent mobiliser ce volume sanguin à tous moment grâce à leur composante musculaire.

3. Les capillaires

Les capillaires sont des vaisseaux sanguins extrêmement petits qui relient le système artériel au système veineux fermant ainsi la boucle de la circulation sanguine. La composition de ces capillaires se limite à un endothélium, une lame basale et quelques péricytes. Les capillaires irriguent la quasi-totalité des tissus de l'organisme et permettent les différents échanges entre le sang et les cellules.

Les capillaires peuvent différer en fonction des besoins physiologiques de chaque tissu. On distingue ainsi trois types de capillaires (**Risau, 1995**) :

- les capillaires continus : les cellules endothéliales forment un revêtement interne complet sans espaces intercellulaires ni intracytoplasmiques.
- les capillaires fenestrés : le cytoplasme des cellules endothéliales est percé de pores (fenestrations) présentant parfois une obturation par un diaphragme. Ils sont présents dans les tissus où les transferts (filtration, échanges de molécules) sont nécessaires.
- les capillaires discontinus : les cellules endothéliales possèdent de véritables orifices transcytoplasmiques. Ces structures favorisent le transfert rapide et moins sélectif de macromolécules et de cellules (dans la moelle osseuse, par exemple).

4. Le système lymphatique

Comme nous l'avons vu précédemment, les vaisseaux sanguins sont chargés d'approvisionner les tissus en oxygène, nutriments ... et d'évacuer les déchets et le dioxyde de carbone. Ce sont les capillaires qui sont impliqués lors de ces échanges sang/tissus. La pression sanguine cause une fuite continue de plasma des capillaires vers l'espace interstitiel. La principale fonction du système lymphatique est de drainer l'espace intercellulaire (**von der Weid and Zawieja, 2004**). Le système lymphatique est constitué d'une arborescence de vaisseaux à extrémités borgnes par lesquelles les fluides, macromolécules et autres cellules (leucocytes extravasés, cellules présentatrices d'antigènes) entrent. Ainsi la lymphe est transportée dans le réseau de vaisseaux lymphatiques et retourne à la circulation sanguine par le canal thoracique au niveau des veines sous-clavières. Sur son trajet la lymphe passe au niveau de la chaîne des ganglions où des particules étrangères peuvent y être détectées et déclencher la réponse immunitaire spécifique. Enfin, la lymphe joue un rôle nutritif puisqu'elle permet d'acheminer une partie des lipides absorbés par l'intestin et un rôle d'épuration en véhiculant une partie des déchets cellulaires. (**Alitalo et al., 2005**)

B. Formation du système vasculaire

Au cours de l'embryogenèse, la constitution du système vasculaire mature se décompose en deux processus successifs que sont la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse correspond à l'apparition des vaisseaux primaires. Par la suite, ce réseau se ramifie et se stabilise au cours de l'angiogenèse (**Figure 2**).

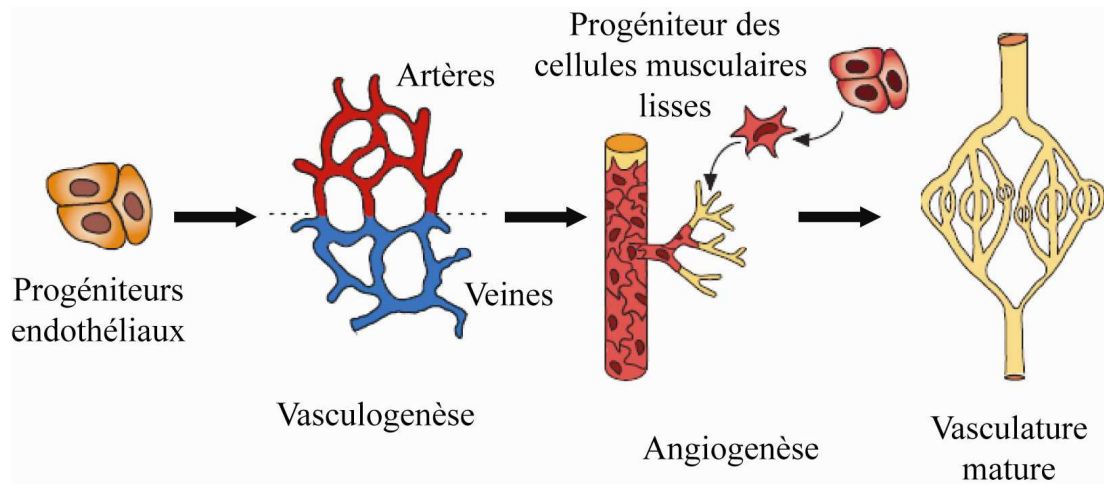


Figure 2 : Formation du système vasculaire : vasculogenèse et angiogenèse

La formation du réseau vasculaire se décompose en étapes successives. Les progéniteurs endothéliaux se différencient en cellules endothéliales artérielles et veineuses qui s'assemblent pour former le réseau vasculaire primitif au cours de la vasculogenèse. Au cours de l'angiogenèse, le réseau vasculaire primitif s'étend et se développe. Enfin, le réseau vasculaire suit une étape de maturation durant laquelle les cellules musculaires lisses stabilisent l'édifice pour former un système vasculaire mature. D'après (**Carmeliet, 2003**).

1. Vasculogenèse

Les cellules embryonnaires doivent pouvoir se nourrir, respirer et évacuer leurs déchets avant même que l'intestin, les poumons et les reins ne soient en place. Toutes ces fonctions sont assurées par les vaisseaux primaires issus de la vasculogenèse. La vasculogenèse se met en place à différents moments en fonction des territoires de l'embryon ; elle est initiée chez l'embryon au niveau du sac vitellin (**Baldwin, 1996**). D'après une étude du développement vasculaire physiologique de la souris, la vasculogenèse intra-embryonnaire débute autour du primordium de l'endocarde à 7,3 dpc (days postcoitum) et se poursuit dans l'aorte dorsale à 7,6 dpc (**Drake and Fleming, 2000**).

Le réseau capillaire primitif se forme par croissance et fusion d'îlots sanguins puis se différencie pour former le système artério-veineux de la circulation sanguine (**Figure 2**). Les cellules périphériques des îlots sanguins se différencient en cellules endothéliales alors que les cellules situées au centre des îlots sont des précurseurs hématopoïétiques et des cellules sanguines (**Flamme et al., 1997**).

La vasculogenèse n'a pas lieu au même moment dans tous les territoires de l'embryon. Elle commence par le sac vitellin, puis autour du primordium de l'endocarde, les aortes dorsales etc et l'angiogenèse arrive plus tard (sauf apparemment dans le poumon où c'est simultané).

L'origine commune des progéniteurs endothéliaux et hématopoïétiques est suspectée depuis le début de XX^{ème} siècle. Elle a été confirmée dans plusieurs modèles animaux (oiseaux, souris) (**Jin and Patterson, 2009**). Plus récemment, cette même origine commune a pu être démontrée sur des embryons humains. Une étude montre qu'un pool de cellules KDR⁺ CD34⁻ d'origine mésodermique apparaissant au début de la 4^{ème} semaine de gestation pourrait représenter la population de précurseurs hémangioblastiques des lignées endothéliale et hématopoïétique. Au cours du développement, ces cellules KDR⁺ CD34⁻ vont progressivement co-exprimer l'antigène CD 34 en même temps que les vaisseaux sanguins apparaissent. Parallèlement, un contingent de cellules KDR⁺ CD34⁻ suspectées d'être des hémangioblastes, va persister au niveau du plancher de l'aorte jusqu'à l'apparition des premiers foyers cellulaires hématopoïétiques intra-embryonnaires (**Cortes et al., 1999**).

Longtemps considéré comme un mécanisme spécifique de l'embryogenèse, il s'avère au contraire que la vasculogenèse est également réactivée chez l'adulte en conditions pathologiques ou physiologiques. De nombreuses recherches ont donc été consacrées à l'étude des facteurs impliqués dans la régulation de la vasculogenèse afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. A titre d'exemple, une étude de cancérologie de 2006 a montré l'implication du VEGF et du PlGF dans la vasculogenèse chez l'adulte. Leurs résultats, obtenus sur des modèles murins de transplantation de moelle osseuse, montrent qu'une élévation locale de l'expression du VEGF et/ou du PlGF au site tumoral favorise la vasculogenèse *in vivo*. Ces facteurs auraient un rôle dans le recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants ayant pour conséquence la formation de nouveaux vaisseaux fonctionnels (**Li et al., 2006**).

2. Angiogenèse

L'angiogenèse est définie comme le processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. Différents mécanismes décrivant ce processus ont été décrits dans la littérature : l'angiogenèse par bourgeonnement et l'angiogenèse par intussusception (**Figure 3**). D'autre part, on distingue l'angiogenèse physiologique de l'angiogenèse pathologique.

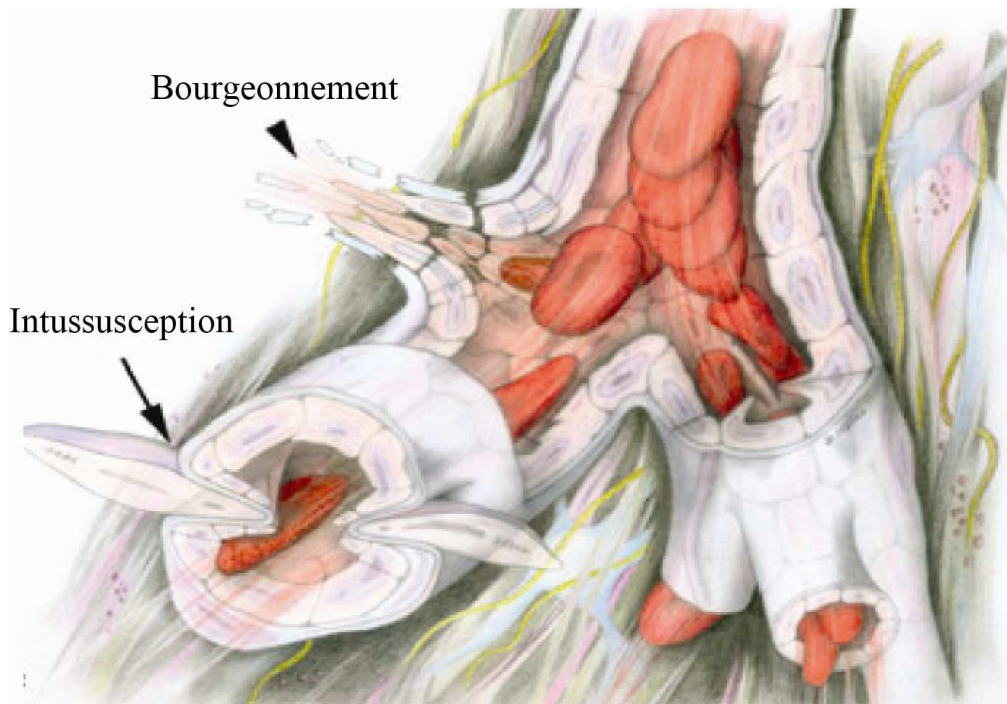


Figure 3 : Les différents types d'angiogenèse

L'angiogenèse par bourgeoisement se fait comme son nom l'indique par bourgeoisement d'un vaisseau préexistant à partir de la migration et de la prolifération de cellules endothéliales (pointe de flèche). L'angiogenèse par intussusception se fait par division d'un vaisseau préexistant (flèche). D'après (**Kassmeyer et al., 2009**).

a. Mécanisme d'angiogenèse par bourgeoisement

Ce mécanisme d'angiogenèse fut le premier décrit. Il nécessite la coordination de plusieurs étapes bien définies qui sont finement régulées par de nombreuses molécules agonistes et antagonistes (**Distler et al., 2003**). Ces différentes étapes ainsi que les molécules impliquées sont répertoriées dans la **Figure 4**.

- Vasodilatation et perméabilité des vaisseaux préexistants : L'angiogenèse est initiée par une vasodilatation du vaisseau préexistant qui implique l'oxyde nitrique (NO). La perméabilité vasculaire est augmentée en réponse au VEGF, permettant ainsi l'extravasation de protéines plasmatiques qui serviront de support aux cellules migrantes. Cette augmentation de perméabilité vasculaire se fait par l'intermédiaire de la formation de fenestrations et de canaux transendothéliaux (VVOs : vesiculovacuolar organelles) mais elle passe également par une redistribution de PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) et de la VE-cadhérine. (**Carmeliet, 2000**)
- Déstabilisation des vaisseaux et dégradation de la membrane basale : Les vaisseaux sont déstabilisés par le détachement des cellules musculaires lisses périphériques (**Distler et al., 2003**). La dégradation de la matrice extracellulaire est une étape importante puisqu'elle

permet de libérer la voie pour les cellules migrantes mais aussi pour les facteurs de croissance qui, en l'absence de dégradation, seraient séquestrés dans la matrice. Les MMPs constituent une famille d'enzymes protéolytiques qui assurent collectivement la dégradation de toutes les molécules de la MEC (Gabison et al., 2003).

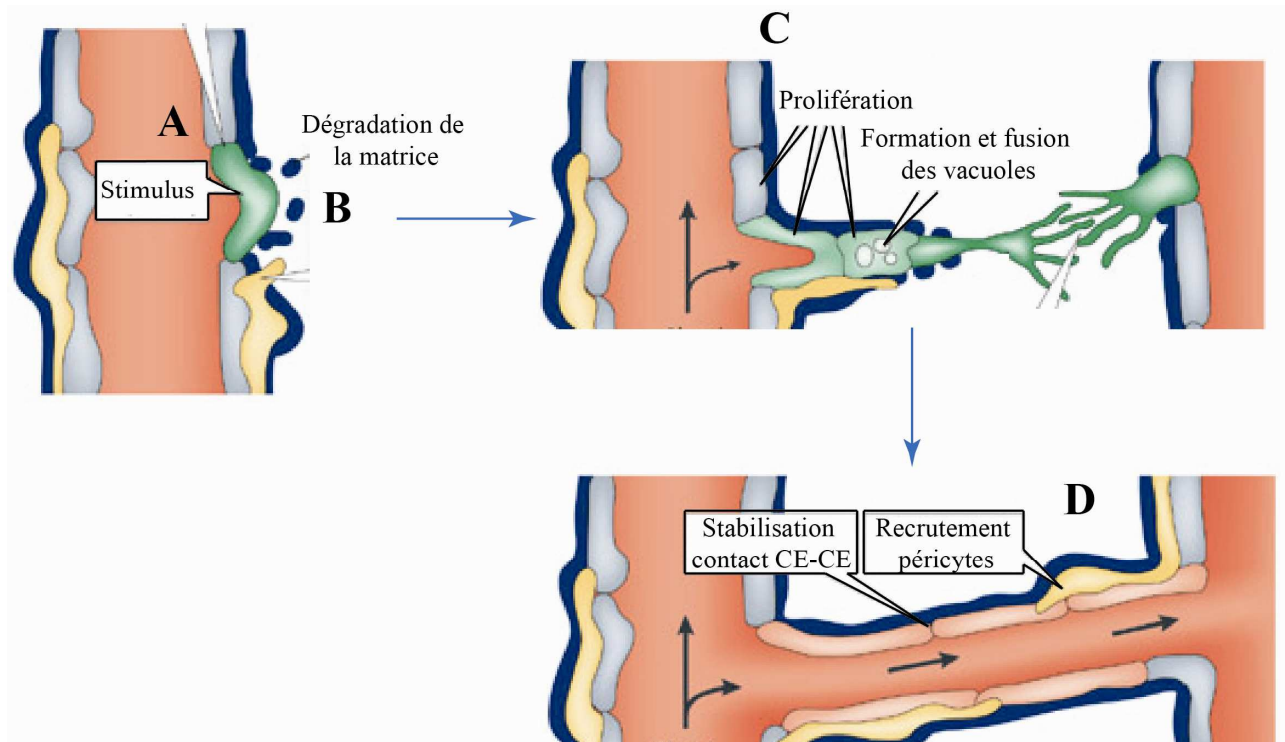


Figure 4 : Mécanisme d'angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement est initiée par la vasodilatation et la perméabilité d'un vaisseau préexistant en réponse à un stimulus angiogénique (A). Le vaisseau est ensuite déstabilisé et la matrice extracellulaire dégradée pour ouvrir la voie aux cellules migrantes (B). Les cellules endothéliales se mettent à migrer et à proliférer pour former un nouveau bourgeon endothélial (C). Enfin, les cellules endothéliales s'organisent pour former la lumière du tube vasculaire et les cellules péricytaires sont recrutées pour stabiliser le nouveau vaisseau (D). D'après (Adams and Alitalo, 2007).

- Prolifération et migration des cellules endothéliales : Sous le contrôle de stimuli angiogéniques, les cellules endothéliales vont migrer en utilisant certaines molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire comme les intégrines. Ainsi, l'intégrine $\alpha v \beta 3$, qui n'est généralement pas exprimée dans les vaisseaux sanguins chez l'adulte, apparaît au niveau de l'endothélium au cours du développement et au cours de processus angiogéniques pathologiques (Stupack and Cheresh, 2004). Ceci suggère que cette intégrine pourrait avoir une fonction importante durant l'angiogenèse et la néovascularisation au cours du développement. De nombreuses études vont dans ce sens (Eliceiri and Cheresh, 1999).

L'une d'elle a montré que l'angiogenèse au sein du modèle CAM (membrane chorioallantoïde de poulet) se trouvait interrompue en utilisant un anticorps bloquant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ alors que les vaisseaux déjà formés n'étaient pas touchés (**Brooks et al., 1994**). La même équipe publia un an plus tard une seconde étude sur modèles *in vivo* de CAM et de cornée de lapin comparant la contribution des intégrines $\alpha\text{v}\beta 3$ et $\alpha\text{v}\beta 5$ au phénomène d'angiogenèse. L'étude conclut que l'angiogenèse induite par le bFGF ou le $\text{TNF}\alpha$ dépend de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ tandis que l'angiogenèse initiée par le VEGF, le $\text{TGF}\alpha$ ou le phorbol ester fait appel à l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 5$ (**Friedlander et al., 1995**). Le VEGF-A, qui intervient dans de nombreuses étapes de l'angiogenèse, active la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il a été montré que le VEGF-A activait la migration des « tip cells » (cellules endothéliales situées à l'extrémité des bourgeons endothéliaux qui émettent de longs filopodes ou cellules pionnières) et augmentait la prolifération des « stalk cells » (cellules endothéliales situées au niveau du corps des bourgeons endothéliaux ou cellules-tige). Tandis que la migration des « tip cells » est régulée par un gradient de VEGF-A, la prolifération des « stalk cells » est régulée par sa concentration (**Gerhardt et al., 2003**). La voie Notch assure la balance entre « tip cells » et « stalk cells ». En effet, les « tip cells » expriment des ligands Notch comme DII4 qui interagissent avec les récepteurs Notch des « stalk cells ». Cette activation de la voie Notch réprime en retour l'expression des récepteurs au VEGF et confère aux « stalk cells » leur phénotype en les empêchant de devenir « tip cells » (**Siekman et al., 2008**). Cet exemple illustre toute la complexité et la finesse nécessaire à la régulation de ce phénomène complexe qu'est l'angiogenèse.

- Formation de la lumière du tube vasculaire et stabilisation des vaisseaux : La formation de la lumière du tube vasculaire se fait par l'organisation des cellules endothéliales polarisées, pôle apical tourné vers la lumière du tube et pôle basale faisant face à la matrice extracellulaire extérieure au tube vasculaire. Les mécanismes régulant cette étape restent encore peu connus. Cependant, on sait que le VEGF agit sur la taille du diamètre de la lumière du tube. Le VEGF121 et le VEGF165 augmentent le diamètre luminal tandis que le VEGF 189 conduit à une réduction de la taille du vaisseau. D'autre part, les intégrines $\alpha\text{V}\beta 3$ et $\alpha 5\beta 3$ ainsi que le facteur de transcription MEF2C (Myocyte Enhancer binding Factor 2C) affecteraient également la formation de la lumière des néovaisseaux (**Carmeliet, 2000**). Par ailleurs, la protéine CCM1 responsable de malformations cérébrales cavernueuses semble également impliquée dans l'organisation de la lumière vasculaire. En effet, l'extinction de CCM1 par ARN interférence conduit à une altération de la lumière des tubes vasculaires (**Lampugnani**

et al., 2010). Pour finir, le nouveau vaisseau est stabilisé par le recrutement des péricytes à la périphérie du vaisseau prémature. Les mécanismes moléculaires aboutissant à la stabilisation des vaisseaux font intervenir de nombreux facteurs. Le système des angiopoïétines (Ang) et de leurs récepteurs Tie intervient dans la stabilisation des vaisseaux. L'effet principal d'Ang-1 via son récepteur Tie-2 est de stabiliser les vaisseaux en favorisant le recrutement des péricytes. Inversement, Ang 2 tend à affaiblir les interactions cellules endothéliales/ péricytes et donc à entraîner la perte des péricytes entraînant ainsi une régression du vaisseau (**Fuxe et al., 2011**). Par ailleurs, d'autres facteurs sont également connus pour intervenir dans le recrutement des péricytes autour de l'endothélium. Une étude a récemment évalué le rôle de deux facteurs spécifiques dans le recrutement des péricytes dans un modèle de culture en 3D dans une matrice de collagène. Ainsi, ils ont montré que l'inhibition du Platelet Derived Growth Factor-BB et d'un membre de la famille de l'Epidermal Growth Factor (Heparin-Binding-EGF) provoque un défaut de recrutement des péricytes au niveau du tube de cellules endothéliales (**Stratman et al., 2010**).

b. Mécanisme d'angiogenèse par intussusception

Le terme d'intussusception n'est pas un terme spécifique de l'angiogenèse. En physiologie, l'intussusception désigne le mode d'accroissement d'un organisme, d'une cellule vivante, par la pénétration et l'incorporation de matériaux et d'éléments nutritifs empruntés au monde extérieur.



Figure 5 : Représentation tri-dimensionnelle du processus d'angiogenèse par intussusception

Le processus commence par l'invagination des parois opposées d'un vaisseau préexistant à l'intérieur de la lumière du tube vasculaire. Lorsque les parois entrent en contact, elles forment un pont endothélial. Le processus se termine par la perforation du pont endothélial et l'invasion par les fibroblastes et les cellules péricytaires pour former deux vaisseaux distincts. D'après (**Burri et al., 2004**).

Les travaux fondateurs de ce nouveau concept appliqué à l'angiogenèse datent de la fin des années 80. Ce mécanisme fut mis en évidence par Caduff et ses collaborateurs en 1986 au cours d'une étude portant sur la restructuration du lit capillaire sur des poumons de rats (**Caduff et al., 1986**). Quelques années plus tard, le travail de microscopie électronique de Burri lui permit de définir ce mécanisme d'angiogenèse par intussusception comme l'élargissement et la séparation des vaisseaux déjà formés (**Figure 5**). Plus précisément, quatre étapes distinctes sont proposées. Dans un premier temps, il y a création d'une zone de contact entre les deux parois opposées d'un vaisseau, de telle manière à former un pont endothélial. Ensuite, les jonctions intercellulaires de l'endothélium se réorganisent avec une perforation centrale de la bicouche endothéliale pour permettre aux facteurs de croissance et aux cellules de pénétrer dans le lumen. Puis un pilier est formé entre les deux nouveaux vaisseaux au niveau de la zone de contact qui est colonisée par les péricytes et les myofibroblastes. Ces cellules commencent alors à déposer des fibres de collagène afin de fournir un support de matrice extracellulaire nécessaire à la croissance du vaisseau néoformé (**Burri et al., 2004; Burri and Tarek, 1990**).

L'intussusception est impliquée dans trois processus de croissance et de remodelage vasculaire distincts (**Djonov et al., 2003**):

- La croissance microvasculaire intussusceptive (IMG Intussusceptive microvascular growth) permet une extension rapide du plexus capillaire, fournissant une grande surface endothéliale pour les échanges métaboliques. C'est l'observation de ce processus qui a conduit Caduff à décrire ce nouveau concept d'angiogenèse.
- L'arborisation intussusceptive (IAR Intussusceptive arborisation) modifie la taille, la position et la forme du plexus capillaire afin de former une arborescence vasculaire
- Le remodelage des ramifications par intussusception (IBR intussusceptive branching remodeling), comme son nom l'indique, conduit à des modifications pour optimiser la géométrie des ramifications vasculaires.

En conclusion, l'avantage de ce type d'angiogenèse non bourgeonnante est que les néovaisseaux sont générés rapidement de manière économique du point de vue énergétique et métabolique. En effet, ce processus n'a besoin ni d'une prolifération excessive de cellules endothéliales, ni de dégradation de la membrane basale, ni d'invasion des tissus environnants.

3. Angiogenèse physiologique et pathologique

L'angiogenèse est avant tout un processus physiologique qui a lieu au cours du développement embryonnaire mais qui est également réactivé chez l'adulte au cours de la

réparation tissulaire, l'exercice physique ainsi qu'au cours du cycle menstruel et de la grossesse.

Cependant, si les mécanismes d'angiogenèse sont autant étudiés, c'est surtout parce qu'ils sont impliqués dans de très nombreuses pathologies caractérisées soit par une angiogenèse excessive ou anormale, soit par une angiogenèse insuffisante ou une régression vasculaire (**Tableau 1**) (**Carmeliet, 2003**).

La pathologie la plus étudiée reste le cancer. Il a été montré que l'angiogenèse était un élément essentiel de l'évolution et de la progression tumorale (**Folkman, 1971**). Dans les premières phases du développement tumoral, les nutriments sont fournis par les vaisseaux des tissus sains. Alors que la taille de la tumeur augmente, de nouveaux vaisseaux se forment afin d'irriguer la tumeur et d'assurer sa croissance.

Organe	Pathologies humaines ou murines associées
Multiples organes	Cancers (activation d'oncogène, perte de suppresseur de tumeur), maladies infectieuses (pathogènes qui expriment des gènes angiogéniques, induisent le programme d'angiogenèse ou transforment les cellules endothéliales), désordres auto-immuns (activation des mastocytes et autres leucocytes)
Vaisseaux sanguins	Malformations vasculaires, syndrome de DiGeorge (faible expression de VEGF ou de neuropiline-1), hémangiome caverneux (perte des connexines 37 et 40), Télangiectasie Hériditaire Hémorragique (mutation de l'endogline ou de ALK-1), artériopathie après transplantation
Tissu adipeux	Obésité (angiogenèse induite par une alimentation riche en graisse)
Peau	Psoriasis, verrue, allergie, dermatite, cicatrice cheloïdienne, granulome pyogénique, dermatose bulleuse, sarcome de Kaposi chez les patients atteints du SIDA
Oeil	Hyperplasie du corps vitreux (perte d'Angiopoïétine-2 ou VEGF 164, rétinopathie diabétique, rétinopathie du prématuré, néovascularisation choroïdienne (mutation de TIMP-3), Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA)
Poumon	Hypertension pulmonaire primaire, asthme, polypes nasaux
Appareil digestif	Inflammation de l'intestin et maladies périodontales, ascite, adhérence péritonéale
Appareil reproductif	Endométriose, saignements ovariens, hyperstimulation ovarienne, kystes ovariens
Os, cartilage	Arthrite, ostéomyélite, formation d'ostéophytes, synovite

Tableau 1 : Pathologies caractérisées ou causées par une angiogenèse anormale ou excessive. D'après (Carmeliet, 2003).

Les vaisseaux tumoraux diffèrent des vaisseaux normaux et sont caractérisés par une morphologie plus tortueuse, un calibre irrégulier et une perméabilité accrue. Ils permettent

néanmoins d'acheminer les nutriments au site tumoral et de disséminer les cellules tumorales sous forme de métastases à distance du site de la tumeur primaire (**Carmeliet and Jain, 2000**).

Les thérapies qui sont aujourd'hui envisagées visent donc à cibler les voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse. Parmi ces voies de signalisation, on peut citer la voie du VEGF et de ses récepteurs VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (KDR, Flk-1) (**Ferrara and Kerbel, 2005**). Les différentes stratégies thérapeutiques ciblant la voie du VEGF en place ou en cours d'étude sont récapitulées sur la **Figure 6**.

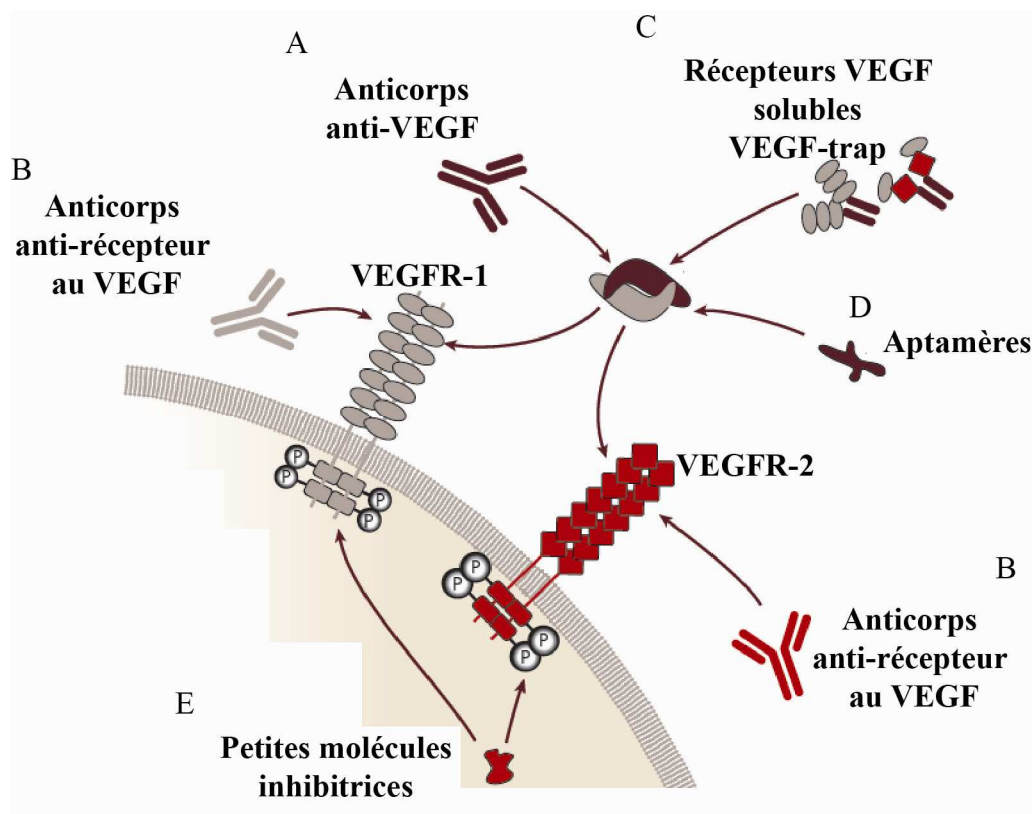


Figure 6 : Stratégies d'inhibition de la voie de signalisation du VEGF

Les principales stratégies d'inhibition de la voie VEGF sont l'utilisation d'anticorps anti-VEGF (A) ou anti-récepteur au VEGF (B) et l'utilisation de VEGF-trap, protéine de fusion d'un récepteur au VEGF et du fragment Fc d'une immunoglobuline agissant comme un récepteur soluble avec une haute affinité pour la VEGF (C). D'autres stratégies utilisent des aptamères anti-VEGF qui neutralisent le VEGF en l'empêchant de se fixer sur son récepteur (D), des petites molécules inhibitrices des tyrosines kinases agissant sur les récepteurs du VEGF qui inhibent l'autophosphorylation des récepteurs au VEGF après fixation du ligand (E). De nouvelles stratégies font également leur apparition avec l'utilisation d'ARN interférence. D'après (**Ferrara and Kerbel, 2005**).

C. Cohérence de l'endothélium vasculaire

1. Généralités sur l'endothélium vasculaire

D'un point de vue anatomique, l'endothélium est un épithélium pavimenteux constitué d'une monocouche de cellules endothéliales jointives tapissant la paroi interne de tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Au cours du développement, l'endothélium se différencie des autres épithéliums car il dérive du mésoderme embryonnaire (la plupart des autres dérivant de l'ectoderme ou de l'endoderme). Il existe peu ou pas de marqueur (ARNm ou protéines) qui soient exprimés spécifiquement et uniformément dans l'endothélium. Cependant, quelques protéines sont candidates au titre de marqueur de l'endothélium : PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule aussi connu sous le nom de CD31) également exprimé dans les plaquettes et les monocytes ; la thrombomoduline présente aussi dans les kératinocytes, les trophoblastes et les leucocytes ; le facteur von Willebrand (vWF) également exprimé dans les plaquettes. Enfin, on compte parmi ces marqueurs potentiels, la VE-cadhérine (VE pour Vascular Endothelial) qui est également exprimée dans les cytotrophoblastes extravilleux humains (Zhou et al., 1997) et les trophoblastes murins (Breier et al., 1996).

Les cellules endothéliales sont impliquées dans de nombreux aspects de la biologie vasculaire incluant : le contrôle de la pression sanguine, la coagulation (thrombose et fibrinolyse), l'athérosclérose, l'angiogénèse physiologique et tumorale ainsi que l'inflammation. L'endothélium contrôle également le passage de molécules et le transit des leucocytes dans et hors du flux sanguin.

Afin de maintenir son intégrité et d'assurer ses fonctions, l'endothélium vasculaire est doté d'un système d'adhérence cellule-matrice et d'un système d'adhérence cellule-cellule qui assurent la cohérence du tissu endothélial. Ici, nous nous intéresserons tout particulièrement aux jonctions intercellulaires de l'endothélium.

Les cellules endothéliales sont capables d'adhérer les unes aux autres et de communiquer grâce à différentes structures jonctionnelles composées de protéines transmembranaires qui assurent l'adhérence homotypique intercellulaire et la connexion entre les cellules. Ces jonctions se répartissent en trois catégories : les jonctions serrées ou étanches, les jonctions communicantes et les jonctions adhérentes qui participent respectivement à la fonction de barrière semi-perméable, à la communication entre cellules et à l'intégrité tissulaire.

Selon les organes, l'endothélium peut se spécialiser en vue de remplir une fonction spécifique de l'organe. Dans le glomérule rénal, la lame basale, sur laquelle repose l'endothélium, est fenêtrée, elle comporte des trous qui lui donnent une fonction de filtre moléculaire. Ces orifices permettent d'une part le passage de toutes les molécules à l'exception des protéines et jouent, d'autre part, un rôle fondamental dans le fonctionnement du rein. Dans le système nerveux, au contraire, les cellules endothéliales sont reliées par des jonctions serrées très complexes restreignant le passage des molécules entre les cellules, ce qui confère des fonctions spécifiques à la barrière hémato-encéphalique (Aird, 2007a; Liebner et al., 2006).

2. Les jonctions serrées

a. Structure et fonction

Les jonctions serrées ou étanches permettent à deux cellules adjacentes d'accoler leurs membranes créant ainsi une barrière contrôlant le passage de molécules dans l'espace intercellulaire et empêchant la diffusion latérale des protéines hors de leur aire fonctionnelle. Situées entre la partie apicale et la partie basolatérale, elles contribuent à la polarisation des cellules endothéliales et épithéliales.

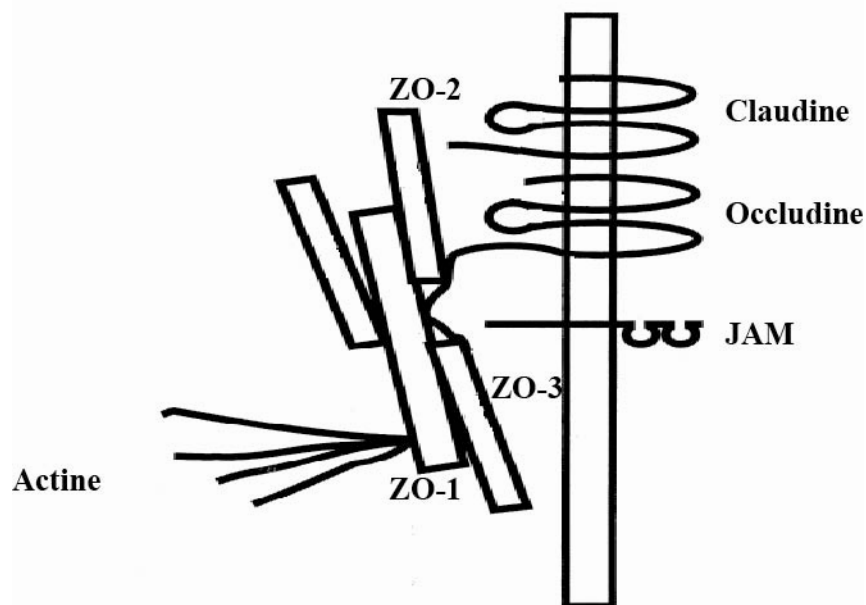


Figure 7 : Composition moléculaire des jonctions serrées

Les jonctions serrées sont constituées de composants membranaires (claudines, occludines et JAM) et de protéines d'échafaudage (ZO-1, -2 et -3). Ces différents composants interagissent avec le cytosquelette d'actine mais également avec des protéines de régulation (GTPases et kinases par exemple). D'après (Lapierre, 2000).

Afin de pouvoir moduler cette perméabilité paracellulaire sous certaines circonstances, les protéines membranaires de la jonction serrée sont reliées au cytosquelette d'actine via des complexes de protéines adaptatrices. Elles peuvent également interagir avec des protéines régulatrices, les petites GTPases par exemple (**Figure 7**).

b. Principaux composants membranaires des jonctions serrées

➤ **Les claudines**

Les jonctions serrées sont formées de multiples composants mais les membres de la famille des claudines en sont les constituants majeurs. Chez les mammifères, 24 membres appartenant à cette famille ont été identifiés. Une structure commune les caractérise et leur confère un rôle à la fois structural et fonctionnel. Ce sont des protéines à 4 domaines transmembranaires, présentant 2 boucles extracellulaires et dont les extrémités N-et C-terminales s'étendent à l'intérieur du cytoplasme. La partie extracellulaire est impliquée dans la régulation du passage des solutés au travers de la monocouche et dans la formation de dimères avec des molécules de claudines de la cellule adjacente. L'extrémité C-terminale, quant à elle, contient un domaine PDZ qui lui permet d'entrer en interaction avec des protéines scaffold : MUPP1 (Multi-PDZ Protein 1), PATJ (PALS1-associated TJ protein), ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (Zonula Ocludens-1, -2 et -3), et MAGUKs (membrane-associated guanylate kinase) (**Lal-Nag and Morin, 2009**).

La claudine-5 est spécifique de l'endothélium vasculaire bien que plus exprimée au sein de la barrière hématoencéphalique (**Morita et al., 1999**). Sa fonction a été en partie déterminée par invalidation génique chez la souris. Dans le cerveau de ces souris, aucune altération du développement ou de la morphologie vasculaire n'a été détectée, les jonctions serrées sont présentes aux jonctions interendothéliales et expriment la claudine-12. Cependant, la barrière hématoencéphalique est plus perméable aux petites molécules <800 Da. Les jonctions serrées composées de claudine-12 jouerait le rôle de tamis moléculaire ayant un filtre à 800 Da (**Nitta et al., 2003**). A l'heure actuelle, d'autres membres de la famille des claudines (claudine-1, -2, -3, -12 et -15) ont été identifiées dans l'endothélium vasculaire de certains organes. Au-delà de leur fonction de barrière, les claudines jouent un rôle dans le transport paracellulaire d'ions. Leur expression différentielle s'adapterait aux besoins spécifiques de perméabilité de chaque organe (**Wallez and Huber, 2008**).

On peut noter qu'il existe un mécanisme de dialogue entre les jonctions serrées et les jonctions adhérentes, médié notamment par la VE-cadhérine et la claudine-5. En effet, il a été

montré que la VE-cadhérine régule positivement le gène codant pour la claudine-5 (**Taddei et al., 2008**). Ce mécanisme moléculaire de dialogue entre VE-cadhérine et claudine-5 tend à expliquer la forte augmentation de perméabilité observée en absence de VE-cadhérine. Celle-ci serait en partie causée par une régulation négative du gène de la claudine-5.

➤ **L'occludine**

L'occludine est le premier composant membranaire des jonctions serrées identifié en 1993. Elle est localisée au niveau des jonctions intercellulaires endothéliales et épithéliales. Elle se compose de 4 domaines transmembranaires qui séparent la protéine en 5 domaines distincts : des extrémités N- et C-terminales (250 acides aminés environ) cytoplasmiques, deux boucles extracellulaires et une partie intracellulaire (**Furuse et al., 1993**). Depuis, de nombreuses études ont cherché à déterminer la contribution respective de chacun de ces domaines aux fonctions de la jonction serrée. Plus particulièrement, la première boucle extracellulaire est impliquée dans l'adhérence de deux cellules adjacentes alors que la seconde est nécessaire à la localisation de l'occludine au sein de la jonction serrée (**Lacaz-Vieira et al., 1999; Medina et al., 2000**).

D'autre part, comme les protéines de la famille des claudines, l'occludine s'associe à de nombreux partenaires intracellulaires comme ZO-1, ZO-2, ZO-3, JAM, VAP-33, JEAP ou CLMP. Certaines de ces protéines lui permettent de conserver cette localisation au niveau des jonctions serrées ou bien encore lui fournissent un ancrage au cytosquelette d'actine (**Feldman et al., 2005; Furuse et al., 1994**).

En ce qui concerne la fonction plus précise de l'occludine, des études phénotypiques de souris déficientes en occludine n'ont révélé ni défaut d'organisation, ni défaut de perméabilité de la jonction serrée (**Saitou et al., 2000**). L'occludine ne serait donc pas essentielle à l'établissement des jonctions serrées. On peut supposer qu'en absence d'occludine, d'autres protéines prennent le relais. Enfin, la présence d'occludine dans les cellules endothéliales du cerveau et sa faible expression dans les cellules endothéliales non neuronales suggère que la régulation de l'expression d'occludine est sans doute un point déterminant de la perméabilité des jonctions serrées dans les cellules endothéliales des différents tissus (**Hirase et al., 1997**).

➤ **Les protéines JAMs (Junctional Adhesion Molecules)**

Les protéines JAMs sont des protéines transmembranaires qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Leur structure comprend un domaine extracellulaire composé de deux boucles de type immunoglobuline, un domaine transmembranaire à un seul

passage ainsi qu'un domaine intracellulaire. Les membres principaux de cette famille sont : JAM-A (ou JAM, JAM-1, 106 antigen et F11R), JAM-B (aussi connue sous le nom de JAM2, VE-JAM, hJAM2 ou mJAM-3) et JAM-C (aussi connue sous le nom de JAM3, hJAM3 and mJAM-2). Plus récemment se sont ajoutées JAM4 et JAML (JAM-like aussi connue sous le nom de AMICA1)(Weber et al., 2007).

JAM-A se situe aux jonctions intercellulaires des cellules endothéliales et épithéliales mais également à la surface des plaquettes et des leucocytes. JAM-B a une distribution plus restreinte notamment au niveau des veinules HEV (High Endothelial Veinules). Ce sont des veinules post-capillaires, lieu privilégié du passage des cellules lymphoïdes de la circulation vers le système lymphoïde et les tissus...

Enfin, à l'image de JAM-A, JAM-C a une large distribution dans les vaisseaux de type HEV (High Endothelial Venule) des organes lymphoïdes, dans les vaisseaux lymphatiques mais aussi dans les plaquettes, les lymphocytes T, les cellules NK (Natural Killer) et dendritiques.(Bazzoni, 2003)

De part leur domaine extracellulaire et leur localisation stratégique aux jonctions interendothéliales, les JAMs participent à l'adhérence interendothéliale mais facilitent également le passage des leucocytes à travers l'endothélium en établissant des interactions homo et hétérophiliques avec les leucocytes (Weber et al., 2007).

Via leur queue cytoplasmique à motif PDZ, JAM-A, JAM-B et JAM-C interagissent avec les protéines scaffold associées aux jonctions serrées comme ZO-1, AF-6 et PUPP1. Ce domaine intracellulaire possède également des sites consensus de phosphorylation, substrats de la PKC (Protein Kinase C), de la PKA (Protein Kinase A) et de la Casein Kinase II. Cependant, il existe aujourd'hui peu de données qui expliquent le rôle *in vivo* de ces motifs (PDZ et sites de phosphorylation) dans la régulation des fonctions attribuées aux JAMs (Mandell and Parkos, 2005).

➤ La molécule ESAM (Endothelial Specific Adhesion Molecule)

La molécule ESAM est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Protéine de 55 kDa, elle est composée de deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline, d'un unique domaine transmembranaire de 25 acides aminés et d'un domaine cytoplasmique de 120 acides aminés (Hirata et al., 2001). Bien que souvent associées aux JAMs, ESAM diffère notamment par ses partenaires cytoplasmiques et sa distribution dans les tissus. Son expression est strictement limitée aux jonctions serrées des cellules endothéliales et aux plaquettes activées. Elle n'est pas exprimée

à la surface des leucocytes ni dans les épithelia (**Wegmann et al., 2006**). Plusieurs propriétés et caractéristiques ont été associées à cette molécule.

Bien que l'on retrouve une localisation similaire d'ESAM et de JAM-A aux jonctions serrées des cellules endothéliales, il a été montré qu'ESAM n'interagit pas avec les mêmes protéines à motif PDZ qui s'associent habituellement à JAM-A. Ceci suggère que les fonctions d'ESAM et de JAM-A diffèreraient ou tout du moins qu'ESAM assure ses fonctions en interagissant avec des partenaires différents.

Au delà de ces différences, ESAM comme JAM-A participe à des interactions homophiliques ce qui lui confère un rôle très probable dans la régulation des contacts interendothéliaux (**Nasdala et al., 2002**).

Enfin, il faut également souligner qu'ESAM apporte sa contribution à l'extravasation des neutrophiles à travers la monocouche endothéliale. L'étude de souris et de cellules endothéliales ESAM $-/-$ a montré :

- une réduction de la transmigration leucocytaire
- une réduction du niveau d'activation de Rho, GTPase impliquée dans la déstabilisation des jonctions serrées
- une réduction de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF

Mises bout à bout, ces observations nous suggèrent qu'ESAM a un rôle important dans la migration des neutrophiles à travers la paroi vasculaire en agissant très probablement sur les contacts intercellulaires (**Wegmann et al., 2006**).

3. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes sont aussi appelées jonctions gap ou macula communicans ou nexus. Ce sont des jonctions intercellulaires qui mettent en relation le cytoplasme de deux cellules voisines. La jonction communicante se présente comme un canal qui traverse les membranes de deux cellules voisines. Chaque canal ou « nexus » est formé de deux hexamères de connexines (protéine à quatre domaines transmembranaires) appelés connexons qui délimitent un pore central par lequel de petites molécules peuvent passer d'une cellule à l'autre (**Figure 8**). Selon la composition des connexons, ils sont dits homomériques s'ils sont constitués de connexines identiques ou hétéromériques s'ils sont constitués de connexines différentes. Les canaux ainsi formés sont alors homotypiques ou hétérotypiques suivant la nature des connexines qui se font face (**Simon and Goodenough, 1998**).

De nombreuses revues qui traitent des jonctions interendothéliales et de la communication entre cellules endothéliales parlent peu ou font abstraction des jonctions

communicantes (Wallez and Huber, 2008) (Liebner et al., 2006) (Bazzoni and Dejana, 2004). Cependant le rôle de ce type de structure au sein de l'endothélium n'est pas à négliger.

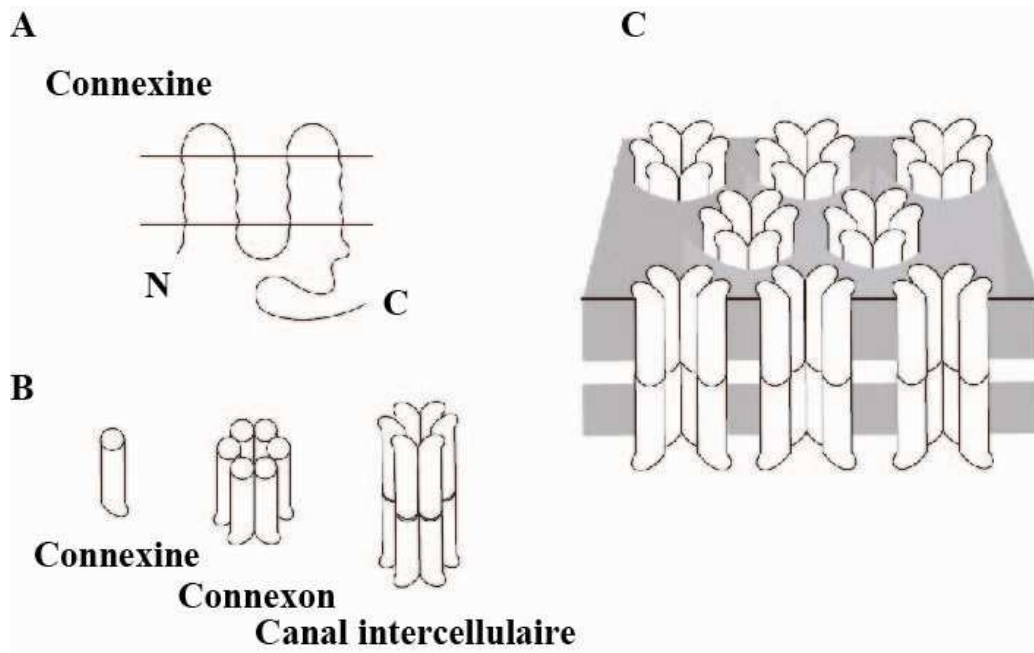


Figure 8 : Représentation schématique des jonctions communicantes

La protéine type des jonctions communicantes est la connexine. Elle est constituée de quatre domaines transmembranaires, d'une boucle intracellulaire et deux boucles extracellulaires et d'extrémités N- et C-terminales à l'intérieur du cytoplasme (A). Les connexines s'assemblent dans la membrane en hexamère appelé connexon qui interagit avec un connexon de la cellule adjacente pour former un canal intercellulaire (B). Les jonctions communicantes sont constituées d'un nombre variable de canaux intracellulaires concentrés en un même endroit de la membrane plasmique de deux cellules (C). Elles connectent le cytoplasme de deux cellules par un pore d'un diamètre de 3 nm environ. D'après (Simon and Goodenough, 1998).

Les cellules endothéliales expriment principalement 3 isotypes de connexines : connexines 37, 40 et 43. Leur expression n'est pas uniforme dans l'endothélium de tous les vaisseaux. Elle peut varier en fonction de l'espèce, du type de vaisseaux et de sa position dans l'arbre vasculaire (Haefliger et al., 2004).

Plusieurs rôles physiologiques ont été attribués aux jonctions communicantes endothéliales. En mettant en relation leur cytoplasme, les cellules peuvent « sentir » ce que font leurs voisines et ainsi acquérir un comportement synchrone avec les autres cellules ; on parle de couplage. Dans l'endothélium vasculaire, ce couplage est important dans les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire qui ont lieu au cours du développement ou de de la réparation tissulaire.

Une des stratégies pour confirmer l'importance de ces jonctions communicantes est le knock-out des principales connexines endothéliales chez des modèles animaux. Alors que les souris Cx37^{-/-} ou Cx40^{-/-} sont viables, les souris Cx37^{-/-}, Cx40^{-/-} ne survivent que quelques jours après la naissance et possèdent d'importants défauts vasculaires. Ces résultats suggèrent, d'une part, qu'il existe sans doute un phénomène de compensation d'une Cx par une autre en cas de délétion unique et d'autre part que les Cx 37 et 40 sont impliquées dans le développement du réseau vasculaire. **(Simon and McWhorter, 2002)**

Une autre étude a, quant à elle, suivi l'expression des trois connexines endothéliales au cours de la réparation tissulaire. Le pattern d'expression des trois connexines endothéliales évolue au cours de la régénération du tissu. Ceci implique donc une certaine dynamique des jonctions communicantes et une action coordonnée des trois connexines endothéliales lors des différentes étapes de la réparation tissulaire **(Yeh et al., 2000)**.

4. Les jonctions d'ancrage

a. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont ubiquitaires et se forment assez précocement pendant le développement du système vasculaire. Leur importance est soulignée par le fait que l'inhibition de l'organisation des jonctions adhérentes cause des défauts majeurs à des stades précoces du développement **(Liebner et al., 2006)**.

La jonction adhérente est un élément essentiel de l'adhérence cellule-cellule. Cette structure est composée de récepteurs transmembranaires, appelées cadhérines, qui relient les cellules entre elles en élaborant des interactions homophiliques via leur partie extracellulaire **(Figure 9)**. Les cadhérines s'associent, via leur partie intracellulaire, à des partenaires cytoplasmiques, notamment les caténines, qui leur permettent un ancrage aux composants du cytosquelette que sont les filaments d'actine et les microtubules **(Hinck et al., 1994)**. Ces complexes moléculaires interagissent également avec d'autres partenaires tels que des molécules de signalisation. Les jonctions adhérentes sont des structures très dynamiques et finement régulées. Elles participent au maintien du lien physique entre cellules et régulent les contacts intercellulaires. Comprendre et élucider l'architecture moléculaire et les mécanismes de régulation des jonctions adhérentes est une thématique de recherche cruciale pour la compréhension de nombreux processus cellulaires et pathologies associées.

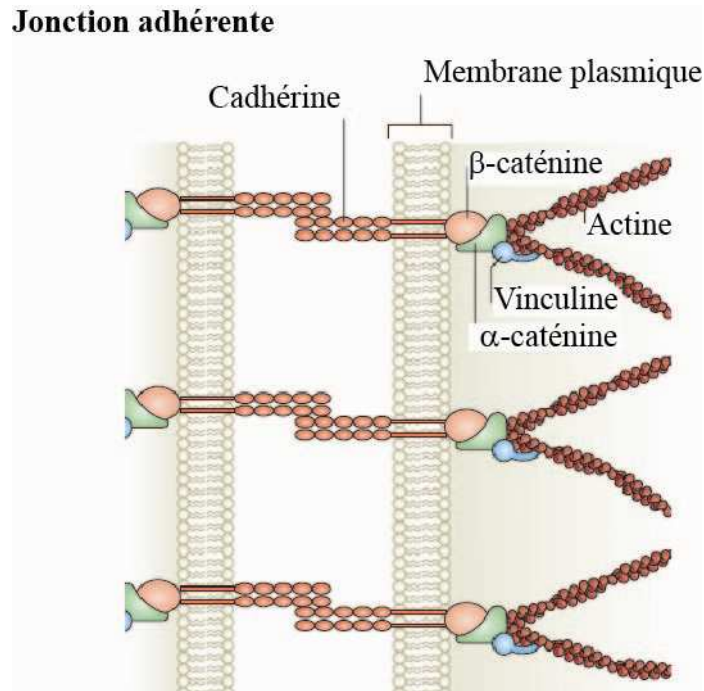


Figure 9 : Représentation schématique d'une jonction adhérente

Les jonctions adhérentes sont constituées de récepteurs membranaires, les cadhérines, qui forment des interactions homophiles avec les molécules de cadhérine des cellules adjacentes grâce à leur domaine extracellulaire. Leur domaine transmembranaire leur permet d'être enchâssé dans la membrane tandis que le domaine cytoplasmique se lie à des partenaires intracellulaires responsables de l'ancrage des jonctions adhérentes au cytosquelette d'actine. D'après (DuFort et al., 2011).

Plusieurs types de cadhérines sont exprimés dans les cellules endothéliales, dont deux sont majoritaires. La VE-Cadhérine constitue un marqueur spécifique des cellules endothéliales et assure la liaison des cellules endothéliales entre elles. La N-cadhérine, quant à elle, assure le contact entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ou les péricytes (Gilbertson-Beadling and Fisher, 1993; Tillet et al., 2005).

Au cours du prochain chapitre, l'architecture moléculaire de la jonction adhérente ainsi que les fonctions associées seront abordées de manière plus détaillée.

b. Les desmosomes

Les desmosomes sont des jonctions intercellulaires dont la principale fonction est d'établir un lien fort avec les filaments intermédiaires du cytosquelette procurant ainsi une certaine élasticité et une certaine tenue aux tissus (**Figure 10**). On retrouve principalement ces structures dans des tissus soumis à de forts stress mécaniques comme l'épiderme et le myocarde. Contrairement aux jonctions adhérentes, les desmosomes sont capables d'atteindre

un fort niveau d'adhérence également appelé hyperadhérence et qui est de plus insensible aux variations de calcium (**Thomason et al., 2010**).

Ces structures d'adhérence sont très présentes dans les épithéliums et peu répandues dans les endothéliums. Cependant, certains types de cellules endothéliales, à savoir celles du système lymphatique ou des microvaisseaux, ont des structures qui s'apparentent aux desmosomes (**Zhou et al., 2004**). Ces structures, appelées complexus adhaerentes, contiennent certaines molécules comme la desmoplakin et la plakoglobine qui relient la VE-cadhérine aux filaments intermédiaires (**Dejana, 2004**).

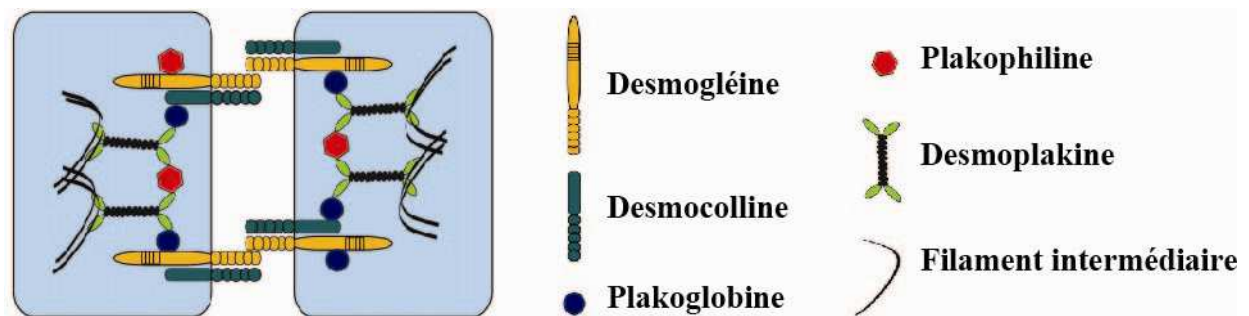


Figure 10 : Structure des desmosomes

Les desmosomes sont composés essentiellement de protéines appartenant aux familles des cadhérines desmosomales (desmoglérine et desmocolline), des protéines Armadillo (plakoglobine et plakophiline) et des plakines (desmoplakine). La desmoplakine permet de relier les cadhérines desmosomales aux filaments intermédiaires. D'après (**Dusek et al., 2007**).

II. Architecture moléculaire de la jonction adhérente interendothéliale

A. Généralités sur les cadhérines

1. Classification des cadhérines

De nombreux processus morphogénétiques au cours du développement ou de la maintenance des tissus adultes font appel aux propriétés adhésives des cellules entre elles. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, divers types de molécules d'adhésion et de jonctions contrôlent les interactions physiques entre cellules. Cependant, il est une classe de molécules particulièrement importante pour la régulation des contacts intercellulaires : ce sont les cadhérines. Leur nom dérive de « calcium dependent adhesion », adhérence dépendante du calcium.

Identifiées chez les vertébrés comme chez les invertébrés, les cadhérines se définissent par la présence d'un ou plusieurs modules extracellulaires (EC pour ExtraCellular) longs de 110 acides aminés et séparés par des zones intermodulaires capables de lier plusieurs ions calcium (**Harrison et al.**). Le nombre de domaines EC ainsi que les homologies de séquences en acides aminés permettent de classer la centaine de cadhérines connues chez les vertébrés en quatre sous-familles. La **Figure 11** illustre les différences d'organisation qu'il existe entre les différentes sous-familles de cadhérines.

a. Les cadhérines classiques de type I et II

Les cadhérines classiques comptent cinq domaines EC notés de l'extrémité N-terminal à l'extrémité C-terminal EC1 à EC5. Leur domaine cytoplasmique est associé aux caténines, qui en retour, interagissent avec le cytosquelette d'actine (**Ivanov et al., 2001**). La distinction entre cadhérines de type I et II se fait par le domaine EC1. En effet, dans ce domaine EC1, les cadhérines de type I possèdent un résidu tryptophane conservé alors que les cadhérines de type II en possèdent deux ce qui leur conférerait une spécificité d'adhésion (**Patel et al., 2006**). Les E-, P-, N-, R-cadhérines (Epithelial-, Placental-, Neuronal- et Retinal-cadhérins) pour le type I et la VE-cadhérine (Vascular Endothelial-cadhérine) pour le type II sont les plus étudiées à l'heure actuelle (**Resink et al., 2009**).

Le schéma général veut que la partie N-terminale extracellulaire des molécules de cadhérine assure le contact entre deux cellules voisines (liaison homotypique) alors que la partie C-terminale intracellulaire régit les interactions avec le cytosquelette via les caténines. L'assemblage des domaines extracellulaires des cadhérines est caractérisé par :

- une forte dépendance au calcium : l'absence de calcium induit une perte de l'activité adhésive et une forte sensibilité aux protéases (**Baumgartner et al., 2000; Nagar et al., 1996**). Les ions calcium fixés entre chacun des modules EC rigidifient l'édifice (**Boggon et al., 2002**).
- une homotypie : une cellule exprimant un certain type de cadhérine s'associe avec une autre cellule exprimant le même type de cadhérine (**Boggon et al., 2002; Koch et al., 2004**).

b. Les cadhérines desmosomales

Les cadhérines desmosomales, desmocollines et desmoglénines, ont une structure similaire aux cadhérines classiques mais diffèrent par leur domaine intracellulaire qui interagit avec la plakoglobin et la desmoplakine et lient les desmosomes aux filaments intermédiaires (**Gumbiner, 2005; Nollet et al., 2000**).

c. Les protocadhérines

Les protocadhérines sont préférentiellement exprimées dans le système nerveux et constituent la plus grande sous-famille au sein des cadhérines. Elles ont seulement été identifiées au cours des quinze dernières années et les études génétiques et fonctionnelles réalisées ont révélé une divergence au niveau de leur partie cytoplasmique et la présence de six ou sept domaines EC dont les séquences sont peu similaires aux domaines EC des cadhérines classiques (**Halbleib and Nelson, 2006; Morishita and Yagi, 2007; Nollet et al., 2000**).

Le rôle de protocadhérines est encore assez imprécis. Celles-ci se localisent aux contacts intercellulaires de manière dépendante au calcium et possèdent des capacités d'agrégation cellulaire semblables à celles des cadhérines classiques suggérant que les protocadhérines élaborent des interactions homophiliques. Les protocadhérines ont une faible activité d'adhérence cellule-cellule qui peut s'expliquer par le manque d'interaction avec les protéines du cytosquelette via leur partie cytoplasmique et la une localisation aux contacts intercellulaires très labile (**Suzuki, 2000**). Cependant, si l'on considère les caractéristiques des protocadhérines comme leur capacité à former des interactions homophiliques et l'expression

de nombreuses protocadhérines à séquences cytoplasmiques variables dans divers organismes, un rôle plus général dans les interactions cellule-cellule pourrait leur être attribué.

d. Les cadhérines non conventionnelles

Un certain nombre de protéines possédant des modules EC n'ont pas pu être classées dans l'une des trois premières sous-familles. Certaines d'entre elles possèdent un nombre très important de domaines EC comme les FAT-cadhérines. D'autres, contrairement aux autres types de cadhérines, ne possèdent pas un mais sept domaines transmembranaires. C'est le cas des cadhérines de type Flamingo. A l'inverse, il existe des cadhérines qui n'ont ni domaine transmembranire, ni domaine cytoplasmique et qui se lient à la membrane grâce à une ancre GPI comme la T-cadherin (Nollet et al., 2000; Resink et al., 2009).

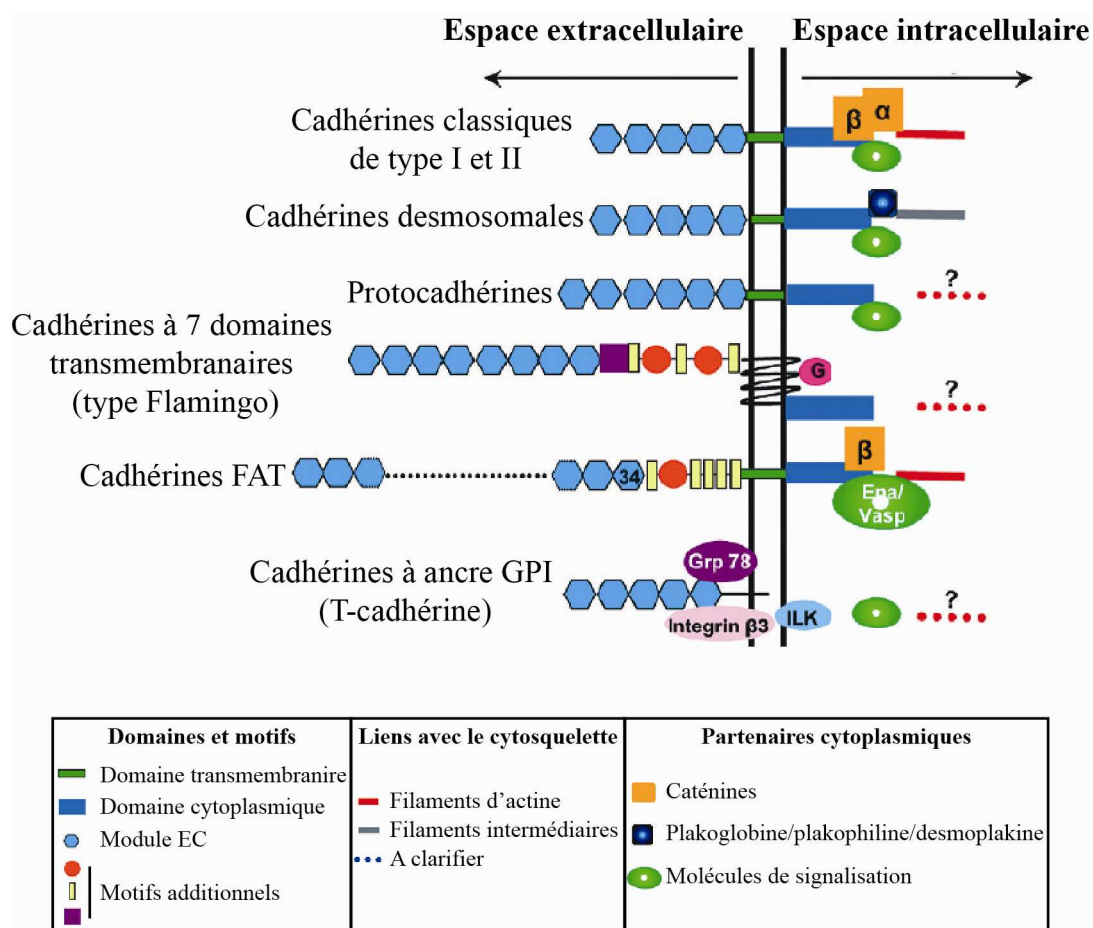


Figure 11 : Structures des différents membres de la superfamille des cadhérines

Les membres de la superfamille des cadhérines partagent plusieurs caractéristiques communes: un nombre variable de modules EC allant de 5 à 34, un domaine transmembranire (exceptée la T-cadhérine) et un domaine cytosolique qui se lie à des partenaires intracellulaires qui permettent l'ancrage aux différents composants du cytosquelette et la transmission de signaux intracellulaires. D'après (Resink et al., 2009).

2. Les principales cadhérines endothéliales

a. La VE-cadhérine

La VE-cadhérine (Vascular Endothelial cadherin) ou cadhérine-5 est une cadhérine classique de type II de 135 kDa. Protéine spécifique de l'endothélium et plus particulièrement des contacts intercellulaires, elle est la cadhérine endothéliale par excellence (**Lampugnani et al., 1992**). Depuis sa découverte en 1991, les connaissances sur la VE-cadhérine ne cessent de se renforcer. Elle a avant tout un rôle dans l'adhérence intercellulaire endothéliale car les modules EC de sa partie extracellulaire élaborent des interactions homophiliques dépendantes du calcium (**Breviario et al., 1995a**). Les différents partenaires avec lesquels elle interagit lui confèrent également un rôle substantiel dans la régulation de l'angiogenèse, la perméabilité, la prolifération, la survie des cellules endothéliales ... (**Vestweber, 2008; Vestweber et al., 2009; Vincent et al., 2004**). Tous ces aspects de la VE-cadhérine seront abordés au cours d'un chapitre qui lui est entièrement dédié (I.B. La VE-cadhérine : un acteur majeur de la jonction adhérente interendothéliale). La E-cadhérine est son homologue dans les cellules épithéliales bien que ce soit une cadhérine classique de type I. Il n'est pas rare d'extrapoler à la VE-cadhérine des résultats obtenus avec la E-cadhérine, la bibliographie de cette dernière étant nettement plus développée. Néanmoins, nous nous efforcerons chaque fois que possible de nous intéresser, plus spécifiquement, aux résultats obtenus sur la VE-cadhérine dans la suite de ce manuscrit.

b. La N-cadhérine

La N-cadhérine (Neural-cadhérine également appelée cadhérine-2) a été identifiée pour la première fois en 1982 dans des tissus neuronaux et décrite localisée aux jonctions adhérentes intercellulaires en 1984 (**Derycke and Bracke, 2004**). Contrairement à ce que son nom indique, elle n'est pas exclusivement exprimée dans les tissus neuronaux. Chez l'adulte, la N-cadhérine se trouve dans les tissus neuronaux mais aussi dans la rétine, les cellules endothéliales et de manière générale dans les tissus d'origine mésenchymateuse (**Derycke and Bracke, 2004**).

Au sein de l'endothélium, son niveau d'expression est comparable à celui de la VE-cadhérine et sa localisation est plutôt surprenante pour une cadhérine. En effet, celle-ci ne se localise pas aux jonctions intercellulaires mais présente une répartition diffuse à la surface cellulaire (**Salomon et al., 1992**). Il a été montré que cette localisation atypique était en réalité

contrôlée par la VE-cadhérine qui exerce une activité d'exclusion de la N-cadhérine de la jonction adhérente endothéliale (Navarro et al., 1998). Plus récemment, la question de l'exclusion jonctionnelle de la N-cadhérine par la VE-cadhérine a été réévaluée. L'extinction de la VE-cadhérine par ARN interférence induit une relocalisation de la N-cadhérine aux jonctions intercellulaires. Cependant la N-cadhérine demeure incapable de compenser la perte de VE-cadhérine dans le processus d'angiogenèse. Ces résultats suggèrent, d'une part que la VE-cadhérine est responsable de l'exclusion jonctionnelle de la N-cadhérine et d'autre part que ces deux cadhérines endothéliales exercent des fonctions distinctes (Gentil-dit-Maurin et al., 2010). En outre, différents modèles ont été étudiés pour souligner l'importance de la N-cadhérine dans l'endothélium. La déficience en N-cadhérine (génétique, ARN interférence ou microinjection d'anticorps bloquant) est responsable de lacunes importantes dans le recrutement péricytaire à la périphérie vasculaire suggérant un rôle prépondérant de la N-cadhérine dans l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules murales (Gerhardt et al., 2000; Luo and Radice, 2005; Tillet et al., 2005).

c. La protocadhérine 12

La protocadhérine 12 (PCDH12) ou VE-cadhérine 2 fut découverte en 1998 dans des cellules endothéliales microvasculaires de souris (H5V) en tant que nouveau membre de la superfamille des cadhérines. Une analyse par PCR, avec des amorces ciblées sur des séquences très conservées du domaine cytoplasmique des cadhérines, a généré un amplicon ne correspondant à aucune cadhérine connue et se rapprochant de la famille des protocadhérines. Uniquement détectée dans plusieurs types de cellules endothéliales mais ni dans des cellules fibroblastiques (L929, 3T3) ni dans des cellules épithéliales (PDV), ceci lui valut le nom de VE-cadhérine 2 (Telo et al., 1998). Comme les autres membres de la famille des protocadhérines, la PCDH12 est capable d'élaborer des interactions homophiliques dépendantes au calcium (Suzuki, 2000; Telo et al., 1998). Contrairement à la VE-cadhérine, la PCDH12 ne se lie pas aux caténines et s'associe peu au cytosquelette d'actine. Il semble que la principale fonction des protocadhérines en général ne soit pas l'adhésion intercellulaire (Suzuki, 2000). Il est probable que la fonction de la PCDH12 dépende des partenaires spécifiques qui lui sont associés parmi lesquels on trouve des molécules de signalisation et/ou du cytosquelette (Telo et al., 1998).

In vivo, il semble que la distribution de la PCDH12 dépende du lit vasculaire. Elle est d'ailleurs plutôt détectée dans des endothéliums impliqués dans la vasculogenèse plutôt que

dans l'angiogenèse. Par ailleurs la PCDH12 s'exprime spécifiquement dans les trophoblastes riches en glycogène et dans les cellules mésangiales du glomérule (**Rampon et al., 2005**).

D'autres données issues de l'analyse de la souris transgénique déficiente en PCDH12 ont montré que la PCDH12 n'est pas essentielle au développement embryonnaire puisque les souris Knock-Out (KO) sont fertiles et viables, sans défaut morphologiques majeurs (**Rampon et al., 2005**). Cependant une analyse plus fine des tissus placentaires a montré que la perte de PCDH12 induit une modification du profil d'expression génique et des altérations morphologiques du placenta (**Rampon et al., 2008**).

Plus récemment une étude transposée à l'humain a mis en avant le rôle de la PCDH12 dans le développement placentaire. Les résultats indiquent que l'expression de la protéine à la surface cellulaire est modulée par le clivage protéolytique en réponse à des cytokines. Il a également été montré que cette activité de clivage est augmentée chez des patientes développant une pré-éclampsie pendant leur grossesse. En effet, la forme sérique circulante de PCDH12 issue de son clivage est fortement augmentée au cours de grossesses pré-éclampsiques comparées à des grossesses normales (**Bouillot et al., 2011**). Ces dernières données ouvrent de nouvelles perspectives en terme d'applications cliniques pour comprendre et diagnostiquer cette pathologie de la grossesse.

B. La VE-cadhérine : un acteur majeur de la jonction adhérente interendothéliale

1. Structure de la molécule et assemblage

a. Mise en évidence et structure

Dès le début des années 90, la description fut faite d'une molécule d'adhérence dépendante du calcium, de poids moléculaire apparent de 135 kDa similaire à d'autres molécules d'adhérence mais apparaissant uniquement dans l'endothélium (**Heimark et al., 1990**). Nommée cadhérine-5 en première intention lorsque son ADNc fut isolé en même temps que sept autres cadhérines, cette molécule va être appelée par la suite Vascular Endothelial-Cadherin (VE-cadherin) (**Suzuki et al., 1991**). Peu après, il fut montré qu'elle est localisée au niveau des jonctions intercellulaires de l'endothélium vasculaire, faisant de la VE-cadhérine un très bon marqueur des cellules endothéliales (**Lampugnani et al., 1992**).

La VE-cadhérine mature est composée de cinq domaines modules EC, d'un unique domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. Sa partie intracellulaire comporte

un domaine juxtamembranaire et un domaine d'interaction pour les caténines en position C-terminale. Cette organisation permet le « clustering » latéral des molécules, les connexions aux cytosquelettes et régit les propriétés adhésives de la VE-cadhérine (Nollet et al., 2000).

b. Assemblage des molécules de VE-cadhérine

Nous avons déjà mentionné précédemment que, pour assurer son intégrité, l'endothélium met en œuvre différents types de jonctions dont les jonctions adhérentes. La VE-cadhérine et plus particulièrement les modules EC de sa partie extracellulaire sont responsables des propriétés adhésives de la molécule.

Plusieurs modèles d'auto-assemblage des molécules de cadhérine ont été proposés (Koch et al., 2004). Plus particulièrement, en ce qui concerne les molécules de VE-cadhérine une auto-association sous forme d'hexamères a été décrite. En effet, l'étude en microscopie électronique d'un fragment recombinant bactérien contenant les modules EC1 à EC4 a permis de mettre en évidence une structure hexamérique en solution (Legrand et al., 2001). Plus tard, l'analyse tridimensionnelle réalisée à partir de clichés de microscopie électronique a montré que l'hexamère est constitué de six molécules de VE-cadhérine agencées tête-bêche qui forme un trimère de dimères (Hewat et al., 2007) (Figure 12 A). Chaque dimère résulte de l'assemblage antiparallèle de deux monomères via les modules EC1 (Al-Kurdi et al., 2004), la trimérisation de ces dimères se faisant en cis via les modules EC3-EC4 (Bibert et al., 2002; Hewat et al., 2007). En outre, il a été montré que cette structure hexamérique est capable d'élaborer des jonctions adhérentes artificielles (Lambert et al., 2005; Taveau et al., 2008).

Cette vision hexamérique a été remise en cause récemment. Pour étudier l'auto-association de la VE-cadhérine, une molécule chimère comportant l'ectodomaine de la VE-cadhérine fusionné à la partie N-terminale de la partie « coil-coiled » de la protéine CMP (Cartilage Matrice Protein) a été générée dans des cellules eucaryotes de type HEK293 (Human Embryonal Kidney 293-EBNA cells). Il a ainsi été démontré que cette chimère peut s'associer en trimère en *cis* mais n'a pas la capacité de former une structure hexamérique (Ahrens et al., 2003). Ce résultat a été confirmé par une étude récente montrant que la protéine recombinante recouvrant les modules EC1 à EC4 de la VE-cadhérine est effectivement capable de former des structures hexamériques alors que la protéine correspondant à l'ectodomaine, produite dans un système eucaryote, s'auto-associe sous forme de dimères (Brasch et al., 2011). Ces deux dernières études suggèrent en réalité que, sous sa forme glycosylée, la VE-cadhérine

s'auto-associe sous forme de dimères *trans* à partir des monomères de deux cellules adjacentes (Ahrens et al., 2003; Brasch et al., 2011; Harrison et al., 2010 ; Wu et al., 2010) (Figure 12 B). Cependant, cette structure a été mise en évidence dans un cristal de protéine ce qui ne reflète pas forcément l'organisation en trois dimensions des molécules de VE-cadhérine au niveau des jonctions intercellulaires. D'autres études seront donc nécessaires pour apporter une réponse définitive à cette question.

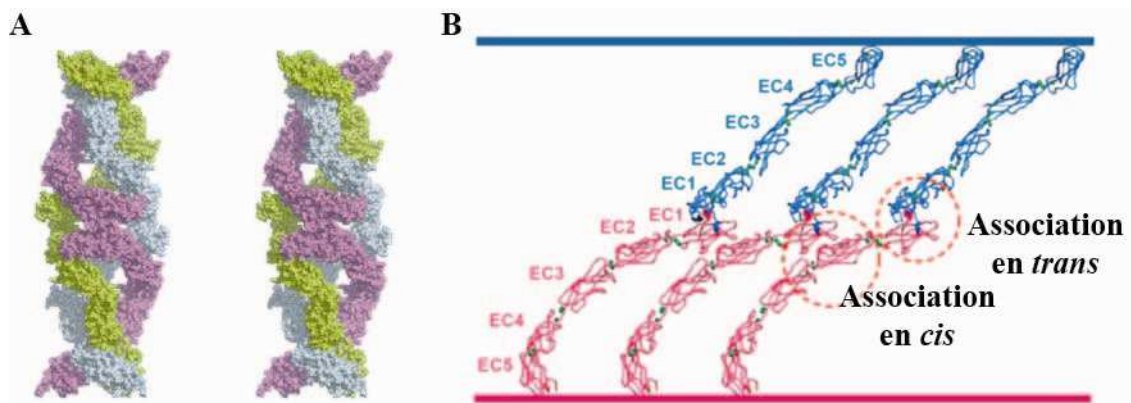


Figure 12 : Deux modèles d'assemblage des molécules de VE-cadhérine

(A) Architecture hexamérique issue de l'analyse de clichés en microscopie électronique de cristaux de fragments recombinants de VE-cadhérine (modules EC1 à 4 fusionnés à un tag Histidine). Dimères de VE-EC1-4 (en violet, vert et bleu) assemblés en trimères. D'après (Hewat et al., 2007). (B) Modèle d'association des cadhérines classiques issu de l'analyse de la structure de cristaux de C-cadhérine. Les domaines extracellulaires de molécules de cadhérines des cellule 1 et 2, en bleu et rose respectivement, de dimérisent en trans par leur module EC1 puis s'associent en cis. D'après (Wu et al., 2010).

2. Fonctions associées à la VE-cadhérine

En plus de la fonction adhésive exercée par la VE-cadhérine, celle-ci assure de nombreuses autres fonctions, liées à ses propriétés d'assemblage homophile et à ses partenaires intracellulaires. Dans cette partie, nous aborderons les principales fonctions exercées par la VE-cadhérine qui confèrent à l'endothélium ses principales caractéristiques.

a. Régulation de la perméabilité vasculaire

L'endothélium a pour mission de contrôler le passage des molécules entre le sang et les tissus sous-jacents. Pour ce faire, les cellules endothéliales régulent le passage des solutés et des cellules en modulant sélectivement la perméabilité trans-cellulaire (à travers les cellules) et la perméabilité para-cellulaire (entre les cellules) (Dejana et al., 2008). La VE-

cadhérine agit essentiellement dans le contrôle de la perméabilité para-cellulaire. Ce rôle essentiel a notamment été mis en évidence avec l'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie extra-cellulaire de la VE-cadhérine, bloquant ses propriétés adhésives et causant une augmentation substantielle de la perméabilité para-cellulaire (Corada et al., 1999). Néanmoins, il existe plusieurs mécanismes par lesquels la VE-cadhérine module la perméabilité para-cellulaire. En effet, la phosphorylation sur tyrosine de la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine (Figure 13), son internalisation ou le clivage de sa partie extracellulaire sont autant de mécanismes capables de réguler la perméabilité de l'endothélium.

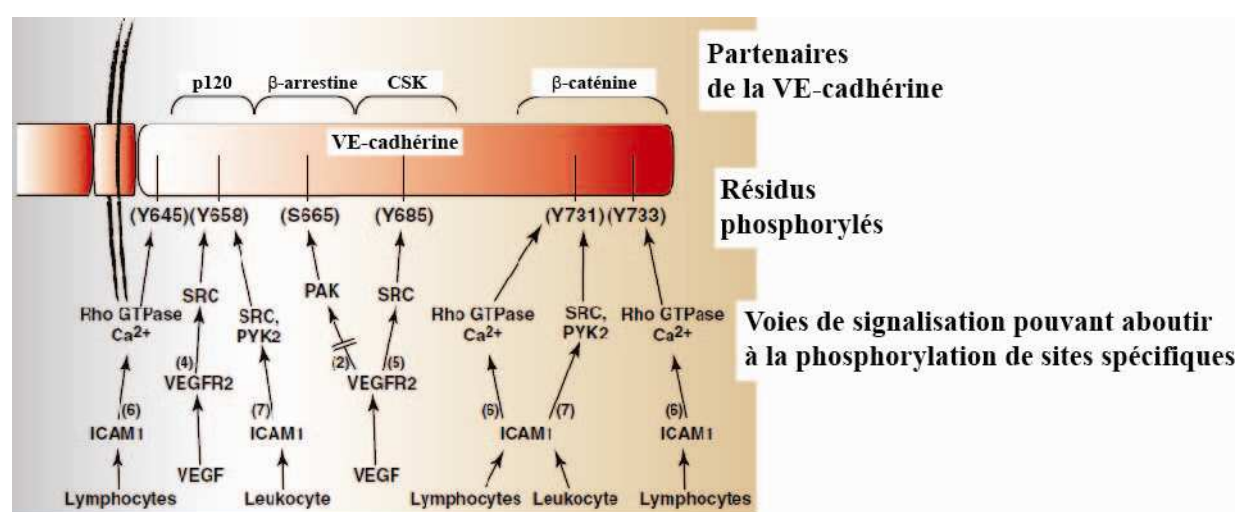


Figure 13 : Phosphorylation de la VE-cadhérine : sites spécifiques et voies de signalisation

Les sites de phosphorylation sur Sérine et Tyrosine sont positionnés sur la molécule. La phosphorylation de la VE-cadhérine sur des sites spécifiques peut réguler positivement (CSK, β-arrestine) ou négativement (p120, β-caténine) son interaction avec des partenaires intracellulaires. Plusieurs voies de signalisation sont connues pour aboutir à la phosphorylation de la VE-cadhérine et répertoriées sur ce schéma. D'après (Dejana et al., 2008).

Ainsi, les connaissances actuelles permettent d'affirmer que la phosphorylation de la VE-cadhérine est associée à une perturbation de la barrière endothéliale et un affaiblissement des jonctions. De nombreuses études ont ainsi montré que divers agents perméabilisants comme l'histamine, le VEGF ou le $TNF\ \alpha$ phosphorylent la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine sur tyrosine (Angelini et al., 2006; Esser et al., 1998; Shasby et al., 2002). Ces différentes observations supportent l'idée d'une relation étroite entre phosphorylation de la VE-cadhérine et perméabilité para-cellulaire. Le mécanisme de phosphorylation de la VE-cadhérine n'est pas encore complètement élucidé mais plusieurs tyrosine kinases et phosphatases sont

associées à la VE-cadhérine : SRC, CSK, PYK 2, VE PTP, DEP 1 (**Allingham et al., 2007; Baumeister et al., 2005; Grazia Lampugnani et al., 2003; Nottebaum et al., 2008; Wallez et al., 2007**).

On peut également noter que la VE-cadhérine est capable de moduler la perméabilité vasculaire par l'intermédiaire de la β -caténine en régulant l'activité transcriptionnelle de la claudine 5. En absence de VE-cadhérine, le complexe FoxO1/ β -caténine /Tcf4 est lié au promoteur du gène de la claudine 5 et réprime son expression. En revanche, en présence de VE-cadhérine, la β -caténine est séquestrée au niveau de la membrane libérant ainsi le promoteur de la claudine 5 et permettant donc son expression (**Taddei et al., 2008**). En contrôlant indirectement l'organisation des jonctions serrées, la VE-cadhérine module la perméabilité vasculaire.

L'internalisation de la VE-cadhérine est une autre voie de régulation de la perméabilité vasculaire. En effet, le niveau d'expression de VE-cadhérine aux jonctions inter-cellulaires est un élément clé de la perméabilité para-cellulaire (**Baumeister et al., 2005; Nottebaum et al., 2008**). Ainsi il a été montré que la présence de p120 aux côtés de la VE-cadhérine protégeait celle-ci de l'internalisation dans des vésicules de clathrine (**Xiao et al., 2005**). En effet, p120 agit comme un signal de rétention, empêchant l'internalisation de la VE-cadhérine. Par ailleurs, indépendamment de p120, il a également été montré que le VEGF induit la perméabilité endothéliale en favorisant l'endocytose par une voie dépendante de la β -arrestine. En effet, la stimulation par le VEGF des cellules endothéliales active la kinase Src qui à son tour phosphoryle VAV2 (facteur d'échange de la guanine de la GTPase Rac). L'activation de Rac par sa liaison au GTP entraîne la phosphorylation sur sérine 665 de la VE-cadhérine et le recrutement de la β -arrestin-2, événement conduisant à l'endocytose de la VE-cadhérine dans les vésicules de clathrine et donc à l'augmentation de la perméabilité endothéliale (**Gavard and Gutkind, 2006**). Prévenir l'internalisation de la VE-cadhérine est donc un moyen de diminuer l'hyperperméabilité à laquelle peuvent être soumises les cellules endothéliales (**Sawant et al., 2011**).

Avec l'internalisation, le clivage est un autre moyen de diminuer le niveau de VE-cadhérine jonctionnelle et donc de provoquer l'ouverture des jonctions intercellulaire. Il est bien connu que la VE-cadhérine est sensible à la lyse enzymatique par la cathepsine G, l'élastase, ADAM10 (**Hermant et al., 2003; Luplertlop et al., 2006; Schulz et al., 2008**). Ce mécanisme est notamment utilisé par les cellules leucocytaires et tumorales pour traverser la barrière endothéliale. En effet, celles-ci sécrètent ces protéases en quantité, provoquant ainsi

le clivage de la VE-cadhérine et l'augmentation de la perméabilité nécessaire à leur passage hors du flux sanguin (**Dejana et al., 2008**).

b. Régulation de la morphogénèse

L'étude de la souris déficiente en VE-cadhérine a également impliqué la VE-cadhérine dans la morphogénèse vasculaire. En 1999, une première étude de l'inactivation génétique de la VE-cadhérine chez la souris a révélé une létalité des embryons au stade E9,5 en raison d'importantes malformations vasculaires intra et extra-embryonnaire. Dans les phases précoces du développement vasculaire (E8,5) des embryons déficients en VE-cadhérine, le programme de différenciation des cellules endothéliales semble normal bien que retardé mais les défauts de vascularisation commencent d'ores et déjà à apparaître dans les régions antérieures de l'embryon. Dans les phases plus tardives du développement vasculaire (E9, 25), la maturation de la vasculature et l'angiogenèse font défaut aux embryons VE-/- . L'anarchie du système vasculaire est encore plus sévère dans les annexes embryonnaires comme le sac vitellin (**Gory-Faure et al., 1999**).

D'autres études ont suivi et montré que la VE-cadhérine est un pré-requis à la maturation des cellules endothéliales en un système vasculaire fonctionnel (**Carmeliet et al., 1999**) et qu'elle joue un rôle dans la formation de la lumière vasculaire en participant à la génération et la fusion des vacuoles (**Yang et al., 1999**). Cependant, le mécanisme d'action de la VE-cadhérine au cours de la morphogénèse reste complexe et il est difficile avec le modèle de souris transgénique de définir finement l'étape clé du développement vasculaire au cours de laquelle la VE-cadhérine entre en action. C'est pourquoi des études plus récentes ont été réalisées sur le poisson zèbre. En effet, le poisson zèbre est un excellent modèle d'étude du développement vasculaire. Les embryons sont presque transparents facilitant l'observation des structures internes sans avoir recours à des méthodes invasives. Le cœur et les vaisseaux sont d'autant plus facilement visualisable par microscopie lorsqu'ils expriment un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur endothélial (**Chico et al., 2008**). Associant le modèle du poisson zèbre avec l'utilisation de morpholino dirigé contre la VE-cadhérine, l'équipe de Dejana a ainsi montré qu'en absence de VE cadhérine le schéma « pattern » vasculaire n'est pas modifié. Cependant, les jonctions entre cellules sont incomplètes, l'activité anarchique des filopodes empêche la stabilité et la maturation des vaisseaux néoformés par fusion des vacuoles et formation de la lumière vasculaire (**Figure 14**) (**Montero-Balaguer et al., 2009**). La VE-cadhérine fonctionne comme un inhibiteur du bourgeonnement filopodial dépendant de la voie VEGFR2-Rac1 et favorise la quiescence

vasculaire nécessaire à la maturation des néovaisseaux comme indiqué sur la figure (Abraham et al., 2009).

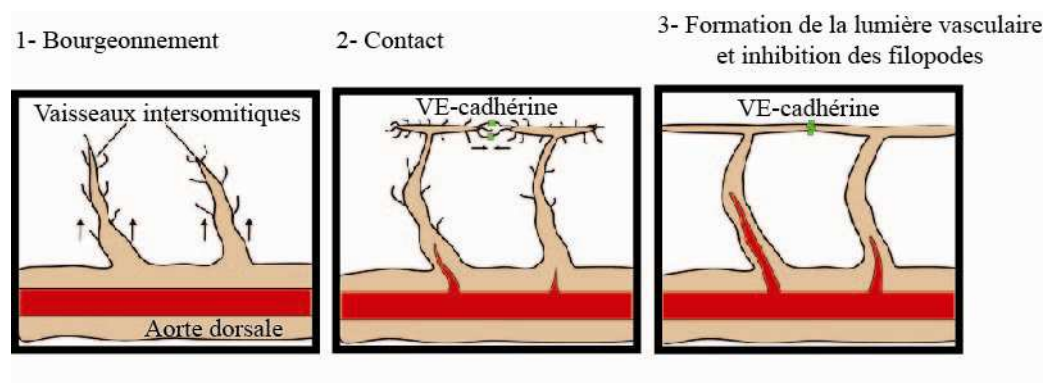


Figure 14 : Implication de la VE-cadhérine dans la morphogénèse vasculaire

La VE-cadhérine est indispensable à la formation et la maturation des vaisseaux néoformés. Modèle du mode d'action des filopodes sur la formation et la maturation des vaisseaux intersomitiques d'embryons de poisson zèbre. D'après (Montero-Balaguer et al., 2009).

c. Inhibition de contact et prolifération cellulaire

A l'état quiescent dans les tissus adultes, les cellules endothéliales ont un faible renouvellement. Cependant lorsque les jonctions sont perturbées, les cellules de l'endothélium sont capables d'entrer en prolifération puis de revenir à un état quiescent lorsque les contacts cellulaires se reforment (Baumeister et al., 2005). Ceci suggère que les cellules endothéliales sont porteuses de signaux capables d'inhiber la prolifération cellulaire. Plus particulièrement la VE-cadhérine est connue pour être médiatrice de l'inhibition de contact. En effet, en transfectant des CHO et L929 qui n'expriment pas de cadhérine avec la VE-cadhérine, la croissance cellulaire est inhibée. A contrario, une transfection avec la VE-cadhérine déléetée de sa partie cytoplasmique permet la formation des adhésions intercellulaires mais aucune inhibition de contact n'est observée. Il semble donc que l'engagement homotypique de la VE-cadhérine dans la jonction et la présence du domaine intracellulaire de la VE-cadhérine soient des facteurs importants dans l'inhibition de la prolifération cellulaire (Caveda et al., 1996). Plusieurs pistes sans doute concomitantes permettraient d'expliquer ce phénomène. Une partie de la régulation de la prolifération cellulaire pourrait venir d'une régulation génique initiée par la VE-cadhérine. Il a été décrit dans les cellules épithéliales cancéreuses que la β -caténine se déplace dans le noyau et active certains gènes dont la Cycline D1 et Myc, connus pour induire l'entrée dans le cycle cellulaire (Dejana, 2004; Tetsu and McCormick, 1999). Concernant la VE-cadhérine, on peut faire l'hypothèse qu'en s'associant avec la β -caténine, elle jouerait un rôle de séquestration. La β -

caténine ne serait plus disponible pour être transporté dans le noyau et activer les gènes en faveur de la prolifération cellulaire (**Wallez and Huber, 2008**). De la même manière, la β -caténine en tant que facteur de transcription peut également réguler la survivine, une protéine IAP (Inhibitor Apoptosis Protein) impliquée dans le cycle cellulaire et plus particulièrement la mitose. L'association VE-cadhérine/ β -caténine régule donc négativement le taux de survivine et maintient les cellules dans un état non prolifératif (**Iurlaro et al., 2004**). On peut également retrouver le même type de régulation régie par p120, qui, séquestré par la VE-cadhérine, freine l'entrée en prolifération. En effet, ne pouvant pas s'associer au facteur de transcription Kaiso, p120 n'est pas transporté dans le noyau et ne peut pas participer à la régulation des gènes cibles de Kaiso (**Ferber et al., 2002**).

Un certain nombre d'études se sont focalisées sur la régulation de la prolifération des cellules endothéliales en réponse au Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Au cours d'une stimulation par le VEGF, la VE-cadhérine s'associe au récepteur du VEGF (VEGFR-2). Cette association, β -caténine dépendante, s'accompagne d'une phosphorylation sur tyrosine du récepteur VEGFR-2 suivi d'une phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine (**Grazia Lampugnani et al., 2003; Zanetti et al., 2002**). Le récepteur au VEGF, ainsi associé à la VE-cadhérine, se trouve alors à proximité des phosphatases jonctionnelles DEP1 qui inhibent la voie des MAP kinases et donc la prolifération en déphosphorylant le VEGFR-2 (**Grazia Lampugnani et al., 2003**) (**Figure 15**). La phosphorylation de la VE-cadhérine en réponse au VEGF induit également un couplage avec la protéine Shc phosphorylée connue pour induire la prolifération cellulaire via la voie des MAP kinases. A proximité des phosphatases associées au complexe (comme les tyrosine phosphatases μ et κ ou SHP2), celle-ci serait déphosphorylée et ne transmettrait plus les signaux intracellulaires responsables de la prolifération cellulaire (**Zanetti et al., 2002**). Dans cette voie de signalisation de prolifération induite par le VEGF, il a été montré que la protéine de la matrice extracellulaire DMP1 (Dentin Matrix Protein 1) inhibe la phosphorylation du VEGFR-2, via l'induction de l'expression de la VE-cadhérine et intercepte le signal d'induction de la prolifération du VEGF (**Pirotte et al., 2011**).

Une autre signalisation intracellulaire fait intervenir la protéine Csk (C-terminal Src kinase) connue pour inhiber les kinases de la famille Src (SFK). En réponse au VEGF, Csk se lie la VE-cadhérine phosphorylée sur la tyrosine 685 ce qui provoque une inhibition de la prolifération (**figure 15**). En effet, l'invalidation génique de Csk dans des HUVECs conduit à une augmentation de la prolifération. D'autre part l'induction de Csk diminue la prolifération de cellules CHO transfectées avec la VE-cadhérine sauvage et n'a pas d'effet sur la

prolifération de cellules CHO exprimant une molécule de VE-cadhérine mutée sur le site tyr685. Ceci montre bien que l'effet inhibiteur induit par Csk sur la prolifération cellulaire ne se manifeste que lorsque la VE-cadhérine expose son site d'interaction avec Csk, c'est-à-dire lorsque la VE-cadhérine est phosphorylée sur la tyrosine 685 (Baumeister et al., 2005) (Figure 15).

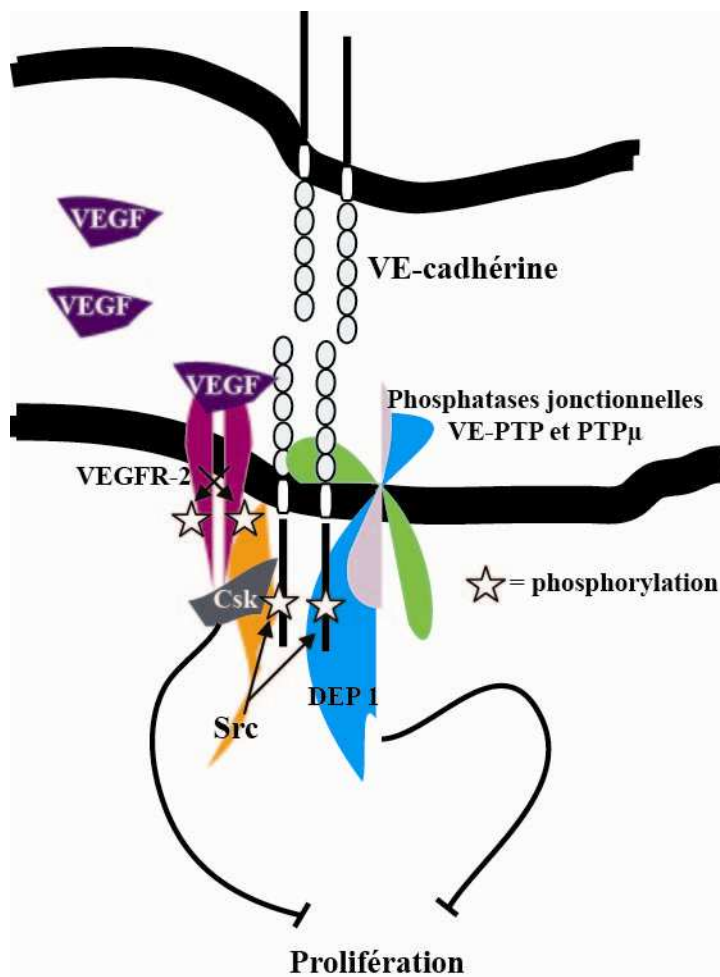


Figure 15 : Modulation de la prolifération cellulaire par le VEGF

En absence de VEGF, les molécules de VE-cadhérine sont associées à la kinase Src. Cependant, les molécules de VE-cadherine sont maintenues dans un état non phosphorylé par des phosphatases partenaires comme VE-PTP et PTPμ. En présence de VEGF, VEGFR-2 s'associe à la VE-cadhérine et Src et les jonctions se dissocient. L'activité kinase conjointe du VEGFR-2 et de Src induit la phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine ce qui conduit au recrutement de Csk. Enfin, Csk et DEP1 participent à l'inhibition de la prolifération cellulaire en empruntant des voies de signalisation indépendantes.

Enfin, un nouveau regard a été apporté par un travail conférant un rôle ambivalent à la VE-cadhérine qui tour à tour stimulerait ou inhiberait la prolifération endothéliale. L'idée novatrice de ce travail suggère une interaction complexe entre les signaux

chimiques et mécaniques perçus par les cellules dans leur micro-environnement. Brièvement, la VE-cadhérine inhibe la prolifération en restreignant l'étalement des cellules et stimule la prolifération en modifiant localement les tensions et la structure du cytosquelette (**Nelson and Chen, 2003**).

Mises bout à bout, toutes ces études hissent la VE-cadhérine au rang de molécule « clé » dans le contrôle de la prolifération endothéliale. Ces multiples partenaires, qu'ils soient facteurs de transcription, kinases (Src, Csk), phosphatases ou molécules du cytosquelette, lui confèrent différents moyens de réguler la prolifération cellulaire en fonction des stimuli environnementaux.

d. Modulation de la survie cellulaire

Dans les vaisseaux sanguins normaux, les cellules endothéliales demeurent dans un état quiescent durant plusieurs années et se renouvellent peu. Cet état est caractérisé d'une part par l'inhibition de contact (détaillée dans le paragraphe ci-dessus), d'autre part par une certaine résistance aux signaux apoptotiques. En communiquant des signaux intracellulaires et en régulant l'expression génique, les protéines jonctionnelles et plus particulièrement la VE-cadhérine contribuent au maintien des cellules endothéliales dans leur état de quiescence (**Dejana et al., 1999**). La contribution de la VE-cadhérine à la modulation de la survie cellulaire a été montrée pour la première fois en 1999 : les souris transgéniques déficientes en VE-cadhérine homozygotes VE-cad^{-/-} ou exprimant une VE-cadhérine délétée de son domaine d'interaction avec la β -caténine présentent une létalité à E9,5 en raison d'un défaut vasculaire causé par l'apoptose des cellules endothéliales (**Carmeliet et al., 1999**). Ceci démontre bien que la VE-cadhérine exerce un effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose. En effet, lorsque la VE-cadhérine est fonctionnelle, celle-ci forme un complexe VE-cadhérine/ β -caténine/PI3K/VEGFR-2 en réponse au VEGF-A. La formation de ce complexe aboutit à l'activation de la protéine sérine/thréonine kinase Akt et à l'augmentation du niveau de Bcl2, deux messagers qui participent à la voie anti-apoptotique (**Figure 16 A**) (Carmeliet et al., 1999).

D'autre part, il a également été montré que dans cette même voie de signalisation VEGF-A/ VEGFR-2/VE-cadhérine/ β -caténine/PI3K, la VE-cadhérine induit l'expression de Gas 1 (Growth arrest-specific 1), protéine dont l'expression est connue pour inhiber l'apoptose (**Figure 16 B**) (**Spagnuolo et al., 2004**).

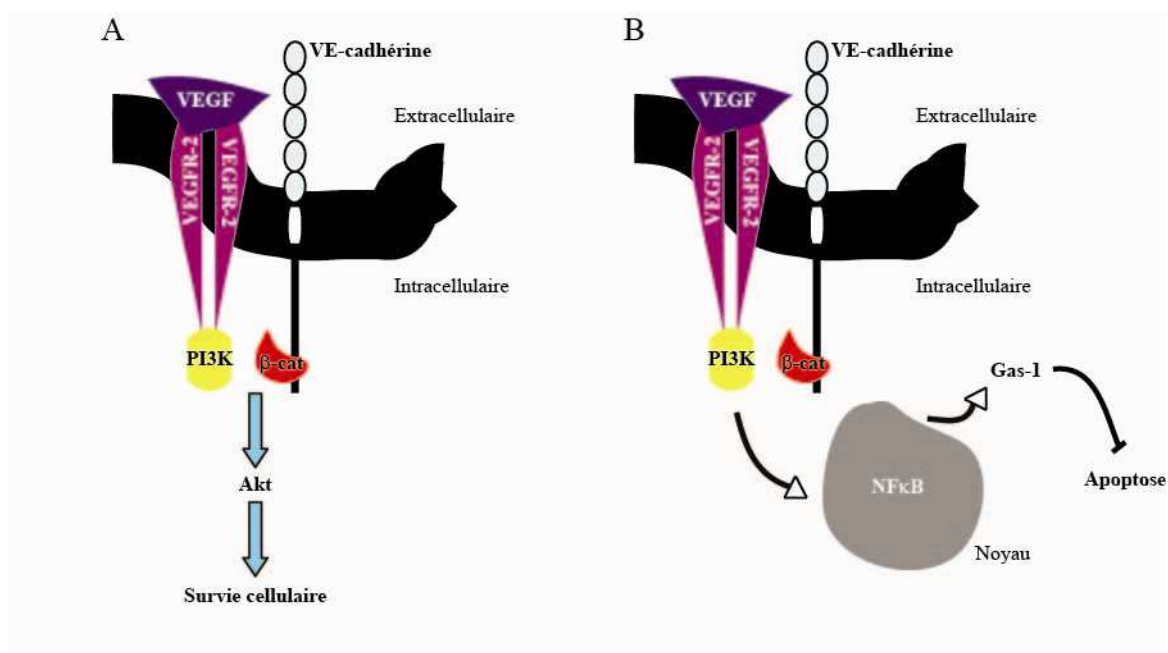


Figure 16 : Modulation de la survie cellulaire régie par la VE-cadhérine

(A) La liaison VEGF/VEGFR-2 induit la formation d'un complexe entre la VE-cadhérine/VEGFR-2. Ces molécules sont respectivement associées à la β -caténine et à la PI3K qui, à elles deux, induisent l'activation de la kinase Akt et favorisent la survie cellulaire. D'après (Carmeliet et al., 1999). (B) La complexation du VEGFR-2 avec la VE-cadhérine induit l'activation de la PI3K et de Rac qui, en retour, provoquent le transport de NF κ B dans le noyau et l'induction de l'expression de Gas-1, facteur connu pour inhiber l'apoptose. D'après (Spagnuolo et al., 2004).

Enfin, plus récemment, une nouvelle voie de régulation de l'apoptose régie par la VE-cadhérine a été proposée. En effet, le facteur de transcription Erg se lie au promoteur de la VE-cadhérine et l'active. L'inhibition de Erg par stratégie antisens provoque la mort cellulaire et augmente le nombre de cellules endothéliales exprimant la caspase-3. Cependant, la surexpression de VE-cadhérine-GFP permet de restaurer partiellement la résistance des cellules endothéliales à l'apoptose induite par l'inhibition de Erg. Ceci suggère fortement que la VE-cadhérine est impliquée dans les signaux de survie dépendant de Erg (Birdsey et al., 2008). Bien que des études antérieures aient souligné le rôle de la VE-cadhérine dans la survie cellulaire VEGF-dépendante, l'implication de Erg dans la voie de survie VEGF-A/VE-cadhérine reste une question encore sans réponse.

C. Les caténines : un partenariat avec la VE-cadhérine

1. La β -caténine

La β -caténine appartient à la famille de protéines Armadillo, motifs répétés d'une quarantaine d'acides aminés caractéristiques des caténines. L'étude structurale de la β -caténine révèle 12 motifs Armadillo assemblés en une superhélice d'hélices, structure compacte qui lui permet d'interagir avec de multiples partenaires dont les cadhérines (**Lilien and Balsamo, 2005**).

Le rôle de la β -caténine dans l'assemblage des jonctions intercellulaires repose sur sa capacité à se lier au CBD (Catenin Binding Domain) des cadhérines et à d'autres protéines adaptatrices, dont l' α -caténine, pour relier le cytosquelette d'actine (**Vincent et al., 2004**). Il a été montré que cette interaction entre β -caténine et E-cadhérine est un élément clé pour la structuration du domaine intracellulaire de la E-cadhérine. En effet, il semble que la β -caténine stabilise la E-cadhérine en masquant le signal de dégradation présent sur la E-cadhérine (**Huber et al., 2001**). De manière similaire, la β -caténine interagit avec la VE-cadhérine des contacts intercellulaire et stabilise celle-ci en permettant son interaction avec le cytosquelette d'actine (**Dejana, 2010**). L'interaction cadhérine/ β -caténine peut-être régulée par des phénomènes de phosphorylation. Une fois phosphorylée, il semblerait que la β -caténine diminue l'activité adhésive des cadhérines aux jonctions intercellulaires ce qui constitue un moyen efficace de réguler la fonction de la VE-cadhérine (**Daugherty and Gottardi, 2007; Lee et al., 2009; Lilien and Balsamo, 2005**). En réalité, la phosphorylation de la β -caténine modifie sa capacité à interagir avec ses partenaires. Ainsi, la phosphorylation de deux résidues tyrosines (142 et 654) induit la dissociation du complexe β -caténine/cadhérine et libère ainsi un « pool » de β -caténine cytosolique (**Brembeck et al., 2006; Lilien and Balsamo, 2005**).

Hors du complexe jonctionnel, la β -caténine est un acteur majeur de la voie de signalisation canonique Wnt (**Figure 17**). En absence de signal Wnt, la β -caténine cytosolique est phosphorylée par les sérine/thréonine kinases Casein Kinase 1 (CKI) et Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) complexées à l'axine et à l'Adenomatous Polyposis Coli (APC). Ainsi phosphorylée, la β -caténine est rapidement ubiquitinée et adressée au protéasome (**von Kries et al., 2000**). La voie de signalisation Wnt est activée lorsque les glycoprotéines Wnt se fixent sur leur récepteur Frizzled (Fzd) à sept domaines transmembranaires et co-récepteur LRP5/6. La fixation de Wnt sur son récepteur entraîne l'activation de Dishevelled (Dsh) qui

court-circuite la dégradation de la β -caténine et induit son accumulation dans le cytoplasme (Nelson and Nusse, 2004). La β -caténine libre devient alors disponible pour interagir avec le co-facteur nucléaire BCL9 (B-Cell Lymphoma 9) ce qui lui permet d'être transportée dans le noyau (Brembeck et al., 2006; Brembeck et al., 2004; Nelson and Nusse, 2004; von Kries et al., 2000). En association avec le complexe TCF/LEF (T Cell Factor/Leucocyte Enhancing Factor), la β -caténine active la transcription de nombreux gènes cibles dont les plus connus c-myc et cyclin D1 sont impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération (Jin et al., 2008). La voie de signalisation induite par la β -caténine peut également être activée par des facteurs de croissance comme le PDGF et l'IGF (Couffignal et al., 2006; Jin et al., 2008) mais aussi certaines protéines qui se fixent sur les récepteurs Fzd comme la Norrie Disease Protein (NDP) également appelée Norrine et la R-Spondine (Hendrickx and Leyns, 2008).

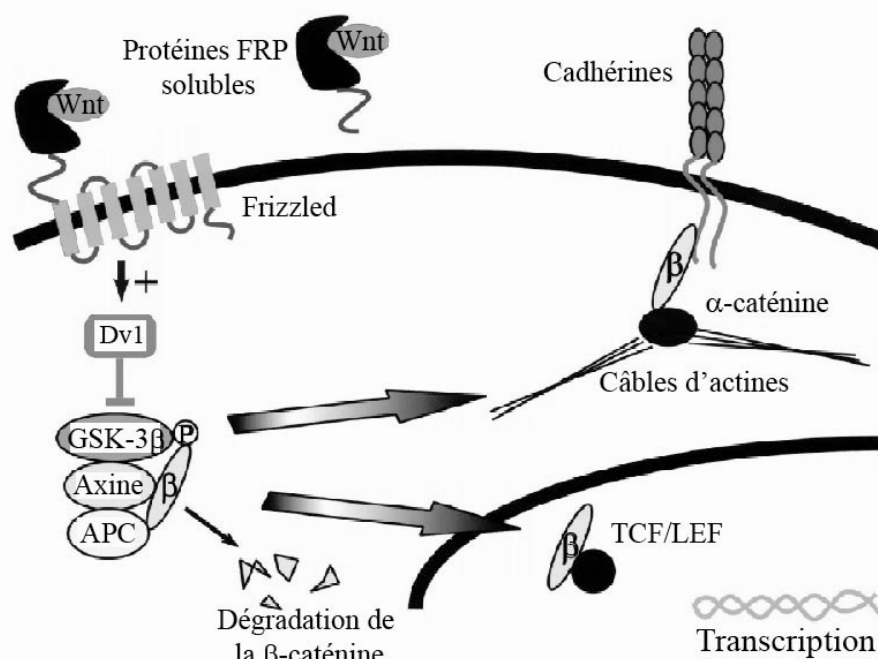


Figure 17 : Rôle de la β -caténine dans la signalisation Wnt

La molécule dishevelled (Dvl) est activée suite à la liaison de Wnt sur le récepteur Frizzled. Elle inhibe la kinase Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) empêchant ainsi la phosphorylation et donc la dégradation de la β -caténine. Dans le cytoplasme, la β -caténine s'associe avec les facteurs de transcription T-Cell Factor/Lymphocyte Enhancer Factor (TCF/LEF) permettant son transport dans le noyau et son activation. A la membrane, la β -caténine échaffaude le complexe adhérent à base de cadhérine. Les protéines Frizzled Related Protein (FRP) solubles ont le même domaine d'interaction avec Wnt que les récepteurs Frizzled mais ne possèdent pas le domaine transmembranaire. Ainsi, en s'associant aux molécules Wnt, les protéines Frizzled Related Protein (FRP) solubles limitent l'interaction de Wnt avec les récepteurs Frizzled. D'après (van Gijn et al., 2002).

En conclusion, la β -caténine exerce deux rôles distincts mais de haute importance. Associée au complexe de cadhérine, elle agit sur l'adhésion intercellulaire. Transportée dans le noyau, elle active la transcription de nombreux gènes cibles importants pour l'angiogenèse. C'est pourquoi, la β -caténine est une molécule clé du développement vasculaire. Le rôle de la signalisation Wnt/ β -caténine dans la formation des vaisseaux a en particulier été démontré dans le développement embryonnaire et post-natal de la barrière hémato-encéphalique (**Liebner et al., 2008**). L'utilisation de souris transgéniques TOPGAL, exprimant la β -galactosidase en présence de la voie de signalisation médiée par TCF/LEF et β -caténine activée, a permis de mettre en évidence que l'activité transactivatrice de la β -caténine est restreinte aux vaisseaux du système nerveux central (**Daneman et al., 2009**). Dans certains cas de pathologies vasculaires la voie Wnt/ β -caténine est également activée et favorise différentes étapes « clé » de l'angiogenèse (**Franco et al., 2009**). Cette activation de la voie Wnt/ β -caténine peut être bénéfique ; elle favorise notamment la réparation tissulaire après un événement ischémique. Cela a notamment été démontré chez la souris après infarctus du myocarde et ischémie du membre inférieur : sFRP1/FzdA agit sur l'activité angiogénique en réponse à un événement ischémique (**Barandon et al., 2003; Dufourcq et al., 2008**). Inversement, la néovascularisation qu'elle induit peut être néfaste dans les cas de rétinopathies diabétiques au cours desquelles on observe une augmentation de la signalisation nucléaire de la β -caténine (**Dejana, 2010; van Gijn et al., 2002**).

2. La γ -caténine (ou plakoglobine)

La γ -caténine aussi appelée plakoglobine est fortement homologue à la β -caténine et appartient donc également aux protéines de la famille Armadillo (**Zhurinsky et al., 2000**). Dans une certaine mesure, la γ -caténine assure la même fonction d'échaffaudage que la β -caténine puisqu'elle interagit avec la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine tout en se liant à l' α -caténine (**Bazzoni and Dejana, 2004**). Ce qui diffère la γ -caténine de la β -caténine, c'est sa capacité à participer aux desmosomes. Or nous avons mentionné précédemment que l'endothélium ne possède pas de desmosome. Une des spécificités de la VE-cadhérine est de se comporter comme une cadhérine desmosomale, et ce, grâce à la plakoglobine. En effet, par l'intermédiaire de la plakoglobine, la VE-cadhérine recrute les protéines desmosomales vimentine et desmoplakine qui assurent la liaison avec les filaments intermédiaires (**Kowalczyk et al., 1998; Shasby et al., 2002**).

Au-delà de son rôle de relais physique entre complexe adhérent et cytosquelette, la γ -caténine comme son homologue la β -caténine joue également un rôle important dans la

transduction du signal et la régulation de l'expression génique. En effet, la γ -caténine comme la β -caténine agit comme co-activateur de la transcription en s'associant aux facteurs de transcription TCF/LEF et Tcf-4 (**Miravet et al., 2002; Simcha et al., 1998**). Les sites d'interactions sur ces facteurs de transcription n'étant pas les mêmes pour la β - et la γ -caténines, ces deux protéines homologues participent à des voies de signalisation qui ne sont pas redondantes.

3. La p120-caténine

La p120-caténine (nommée p120 par la suite) appartient comme la β -caténine, à la famille de protéine Armadillo. Sa découverte date de 1989 à l'époque à laquelle elle fut décrite comme un substrat de la kinase Src (**Reynolds, 2007**). Quelques années plus tard, les données de la littérature ont montré qu'il existe une interaction entre la protéine p120 et le domaine JMD (JuxtaMembrane Domain) des cadhérines, et en particulier entre p120 et un octapeptide du domaine JMD de la VE-cadhérine (**Ferber et al., 2002; Reynolds et al., 1994**). Cette association revêt une grande importance pour les cadhérines puisqu'elle leur permet d'être stabilisées à la membrane. En effet, plusieurs études ont montré que l'expression de p120 empêchait la dégradation des cadhérines, induisant ainsi un effet protecteur sur les jonctions intercellulaires (**Ishiyama et al., 2010**). Inversement, l'extinction de p120 provoque l'élimination des cadhérines de la membrane et la dissociation des jonctions intercellulaires (**Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002**). La VE-cadhérine ne fait pas exception. Il est maintenant clairement établi que p120 régule le niveau de VE-cadhérine à la membrane en contrôlant son endocytose dans des vésicules de clathrine et par la suite sa dégradation (**Chiasson et al., 2009; Xiao et al., 2003; Xiao et al., 2005**). De manière intéressante, on peut également noter que p120 s'associe préférentiellement à la VE-cadhérine pour exclure la N-cadhérine de la jonction (**Gentil-dit-Maurin et al., 2010**). L'interaction entre p120 et VE-cadhérine est, par ailleurs, régulée par des phénomènes de phosphorylation. En effet, suite à sa phosphorylation sur la tyrosine 658, la VE-cadhérine n'interagit plus avec p120 (**Hatanaka et al., 2010; Potter et al., 2005**). Ces dernières données fournissent des éléments qui permettent de comprendre les mécanismes qui régulent la perméabilité vasculaire. En effet, une fois phosphorylée, la VE-cadhérine devient incapable d'interagir avec p120 ce qui entraîne son endocytose puis sa dégradation et par la suite l'ouverture des jonctions intercellulaires (**Reynolds, 2010**).

Deux autres rôles attribués à p120 semblent importants à aborder. Au-delà de sa capacité à réguler le « turnover » des cadhérines à la membrane, p120 est un important

modulateur de l'activité des Rho-GTPases suggérant ainsi que p120 joue un rôle dans le lien qui unit les cadhérines au cytosquelette d'actine (**Reynolds, 2007**). En s'associant de manière fonctionnelle avec les Rho-GTPases, p120 joue un rôle clé dans de nombreux processus cellulaires (**Anastasiadis, 2007**). Pour terminer, d'une manière à la β -caténine, p120 exerce également un rôle au niveau du noyau. Par sa capacité à interagir avec Kaiso, p120 empêche ce facteur de transcription de se fixer sur l'ADN et d'activer l'expression de ses gènes cibles. Ainsi, en exerçant un pouvoir de rétention sur le facteur Kaiso, p120 est un acteur de la répression génique (**Daniel, 2007; Zhang et al., 2010**).

4. L' α -caténine

L' α -caténine est un partenaire indirect des cadhérines. En terme de structure, elle est très différente des autres caténines et se rapproche plutôt de la vinculine, une « Actin Binding Protein » (ABP). En effet, l' α -caténine est constituée, d'une part, de trois domaines VH pour Vinculin Homology domain (**Kobielak and Fuchs, 2004**) et d'autre part, possède un domaine d'interaction direct pour la β -caténine et la γ -caténine, ce qui lui permet d'être reliée indirectement aux cadhérines (**Figure 18 C**) (**Nieset et al., 1997; Obama and Ozawa, 1997**).

Pendant de très nombreuses années, la principale fonction attribuée à l' α -caténine fut de constituer le lien direct entre le complexe cadhérine/ β -caténine/ α -caténine et le cytosquelette d'actine pour maintenir l'intégrité tissulaire (**Figure 18 A**). Cependant en 2005, le travail du groupe de Nelson a tout remis en question. En effet, il s'est avéré que l' α -caténine a la capacité d'interagir avec l'actine et la E-cadhérine mais est incapable de lier les deux simultanément (**Yamada et al., 2005b**).

Le rôle de l' α -caténine est en réalité plus complexe qu'initialement envisagé. L' α -caténine existe sous forme de monomères ou de dimères, les deux formes ayant des propriétés différentes. L' α -caténine monomérique interagit préférentiellement avec le complexe E-cadhérine/ β -caténine alors que le dimère lie plus facilement les filaments d'actine (**Drees et al., 2005**). Le modèle émergent est donc le suivant : le clustering des cadhérines au cours de la formation des jonctions induit une augmentation locale de la concentration en α -caténine, suffisante pour induire sa dimérisation dans le cytoplasme. Le dimère d' α -caténine interfère localement avec le complexe Arp2/3, inhibant ainsi la formation de branchements dans le réseau d'actine (**Figure 18 B**). Ce modèle suggère une interaction labile entre α -caténine et cadhérine et sera rediscuté dans une partie consacrée au lien entre VE-cadhérine et cytosquelette d'actine (**Hartsock and Nelson, 2008**).

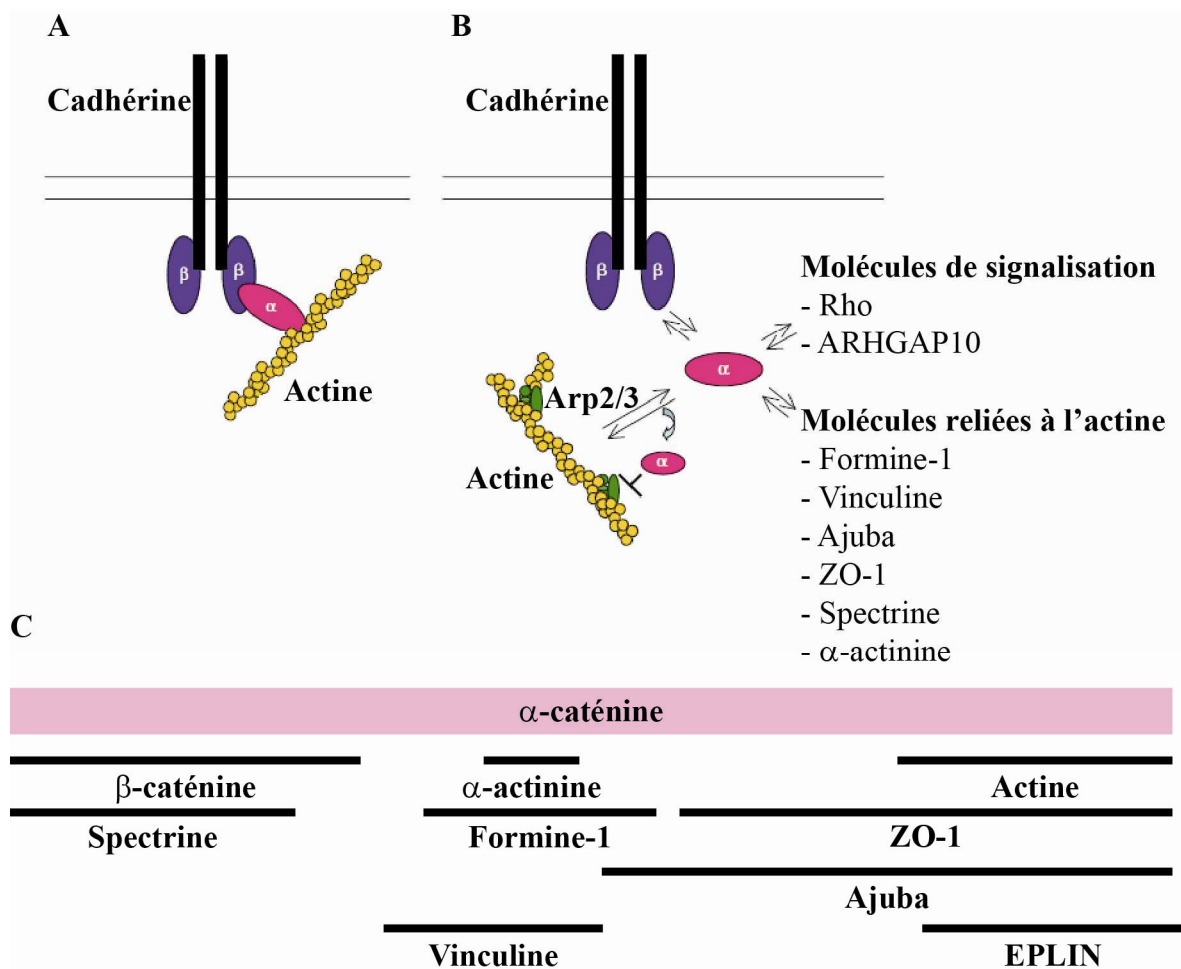


Figure 18 : Modèles de coopération entre cadhérines et cytosquelette d'actine régité par l'α-caténine

(A) Modèle de complexe quaternaire cadhérine/β-caténine/α-caténine/actine qui prévalait jusqu'en 2005. L'α-caténine était considérée comme étant capable d'établir un lien direct entre la β-caténine et le cytosquelette d'actine, accrochant ainsi les filaments d'actine au complexe jonctionnel. (B) Mécanismes d'action de l'α-caténine sur le lien cadhérines/cytosquelette d'actine. L'α-caténine oscille entre le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine. Elle est capable de réguler l'actine, en inhibant le complexe Arp2/3, par l'intermédiaire de nombreuses protéines se fixant à l'actine ainsi que des molécules de signalisation. (C) Domaines de liaison de l'α-caténine avec plusieurs protéines liées à l'actine. D'après (Abe and Takeichi, 2008; Scott and Yap, 2006; Watabe-Uchida et al., 1998a).

D. Le cytosquelette

A priori, le terme cytosquelette peut évoquer une structure figée. Dans les faits, il n'en est rien. Plus la recherche avance et plus la vision des biologistes sur le cytoplasme de la cellule change. En effet, le cytosquelette est responsable de nombreux processus cellulaires :

forme et motilité de la cellule, mitose, mouvements des organites... Par sa capacité à s'assembler et se désassembler rapidement, le cytosquelette confère à la cellule une organisation très dynamique et réactive aux stimuli environnementaux.

1. Les différents composants du cytosquelette

a. Les microtubules

➤ Généralités sur les microtubules

Constituant l'un des trois composants du cytosquelette, les microtubules sont des polymères essentiellement constitués de dimères d' α - et β -tubulines qui sont des protéines globulaires. Un microtubule est le résultat de l'assemblage de 13 protofilaments parallèles qui lui donnent une forme de tube (25 nm de diamètre externe), chaque protofilament étant constitué de dimères de tubuline reliés par des liaisons non covalentes (**Figure 19**) (**Amos, 2004**). Les microtubules oscillent constamment et de façon stochastique entre phase de polymérisation et de dépolymérisation, ce qui leur confère une instabilité dynamique. La transition entre polymérisation et dépolymérisation est appelée « catastrophe », la transition inverse « sauvetage » (**Nogales and Wang, 2006**). Au cours de ces dernières années, d'innovants développements technologiques ont permis d'étudier la dynamique des microtubules. Plus particulièrement, il est possible de suivre par vidéomicroscopie la dynamique de polymérisation intracellulaire des microtubules en utilisant des marqueurs de l'extrémité + des microtubules fusionnés à la GFP (**Matov et al., 2010**). L'élongation due à l'addition de dimères n'est pas équivalente aux deux extrémités ce qui confère aux microtubules une polarisation. L'extrémité + des microtubules croît plus rapidement bien qu'elle subisse des événements de « catastrophe » et de « sauvetage » tandis que l'extrémité – est peu dynamique (**Hawkins et al., 2010**).

Actuellement, le modèle qui prévaut pour la dynamique des microtubules et le suivant (**Dimitrov et al., 2008; Gardner et al., 2008**):

- Les microtubules en phase de polymérisation incorporent de la tubuline liée au GTP à l'extrémité + créant ainsi une coiffe GTP qui stabilise les microtubules. Celle-ci est hydrolysée peu après son intégration dans les microtubules en tubuline-GDP.
- Lorsque la coiffe GTP est perdue, le microtubule est déstabilisé. Il subit alors une « catastrophe » et se dépolymérise. A l'inverse, lorsqu'un îlot de GTP se retrouve à l'extrémité en dépolymérisation, le microtubule en présence d'une nouvelle coiffe GTP peut reprendre sa polymérisation, ce qui permet son « sauvetage ».

Ce mécanisme n'est pas le seul à réguler la dynamique des microtubules. Il existe en effet de nombreuses Microtubule Associated Proteins (MAPs) capables de s'associer aux microtubules et d'en modifier le comportement dynamique (**Cassimeris and Spittle, 2001**). Ces MAPs peuvent être classées en différentes catégories en fonction du rôle qui leur est attribué : (**Akhmanova and Steinmetz; Maiato et al., 2004**)

- favorisation et stabilisation de la polymérisation des microtubules
- déstabilisation et rupture des microtubules
- liaison des différentes structures entre elles
- activité motrice

Au cours de la division cellulaire, les microtubules forment le fuseau mitotique, élément fondamental pour une bonne ségrégation des chromosomes (**Vernos, 2006**). Des drogues, utilisées pour lutter contre le cancer, comme la colchicine, le taxol et la vinblastine, ciblent les microtubules et interfèrent avec le cycle cellulaire. Comprendre leur mode d'action et les phénomènes de résistance associés ouvrira de nouvelles perspectives dans la lutte contre le cancer (**Dumontet and Jordan, 2010**).

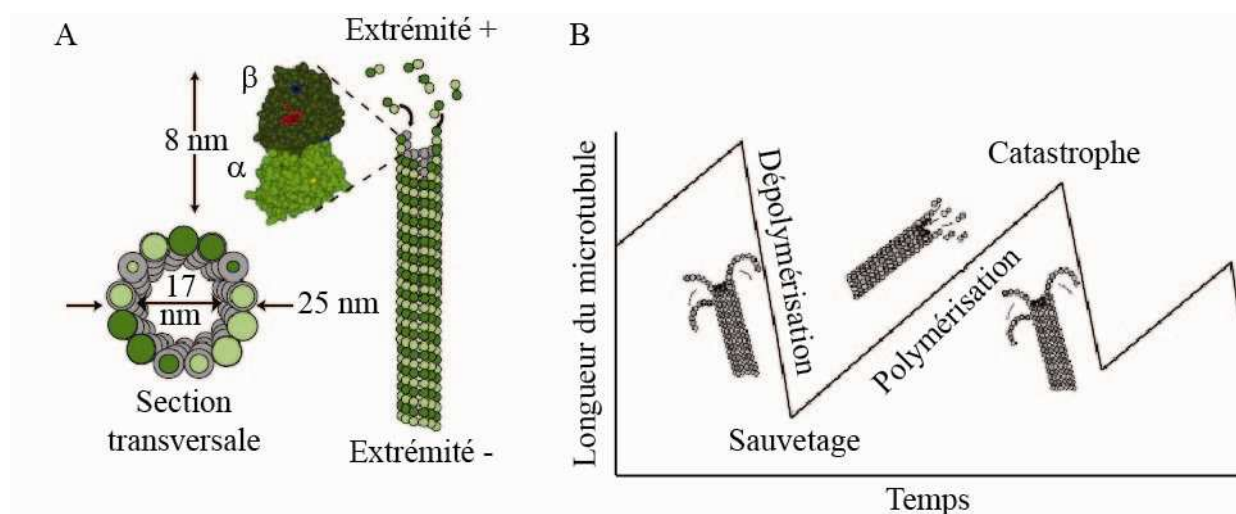


Figure 19 : Structure et dynamique des microtubules

(A) Les microtubules sont des polymères constitués d'hétérodimères de tubuline α (vert clair) et β (vert foncé). Quelques dimères s'assemblent pour initier le filament qui s'étend par ajout de dimère à ses extrémités. L'extrémité + est la plus dynamique et se polymérise/dépolymérise rapidement, l'extrémité - est quant à elle moins dynamique. Le filament de microtubule est un tube de diamètre externe de 25 nm et de diamètre interne de 17 nm. (B) Les microtubules s'allongent par ajout de nouveaux dimères et raccourcissent par dépolymérisation des dimères. Les transitions stochastiques de dépolymérisation à polymérisation sont appelées « sauvetages » et les transitions inverses « catastrophes ». Les microtubules se stabilisent si la fréquence des « sauvetages » augmente et celle des « catastrophes » diminue. D'après (**Hawkins et al., 2010**).

➤ Microtubules et jonctions intercellulaires : un partenariat souvent négligé

Deux raisons peuvent expliquer le fait que le couple microtubules/cadhérine ait été peu étudié. D'une part, il a longtemps été pensé que les centrosomes, centres nucléateurs des microtubules par excellence, représentaient le principal, pour ne pas dire le seul, site d'ancrage des microtubules. D'autre part, les cadhérines étaient plutôt connues pour travailler en étroite coopération avec le cytosquelette d'actine. C'est pourquoi peu d'études se sont intéressées à démontrer le potentiel qu'ont les cadhérines à interagir avec les microtubules. En réalité, de nombreux types cellulaires présentent des distributions spatiales de microtubules non centrosomales essentielles pour les fonctions spécifiques de certains types cellulaires comme les cellules épithéliales, neuronales et les myotubes (**Figure 20 A**) (**Keating and Borisy, 1999**).

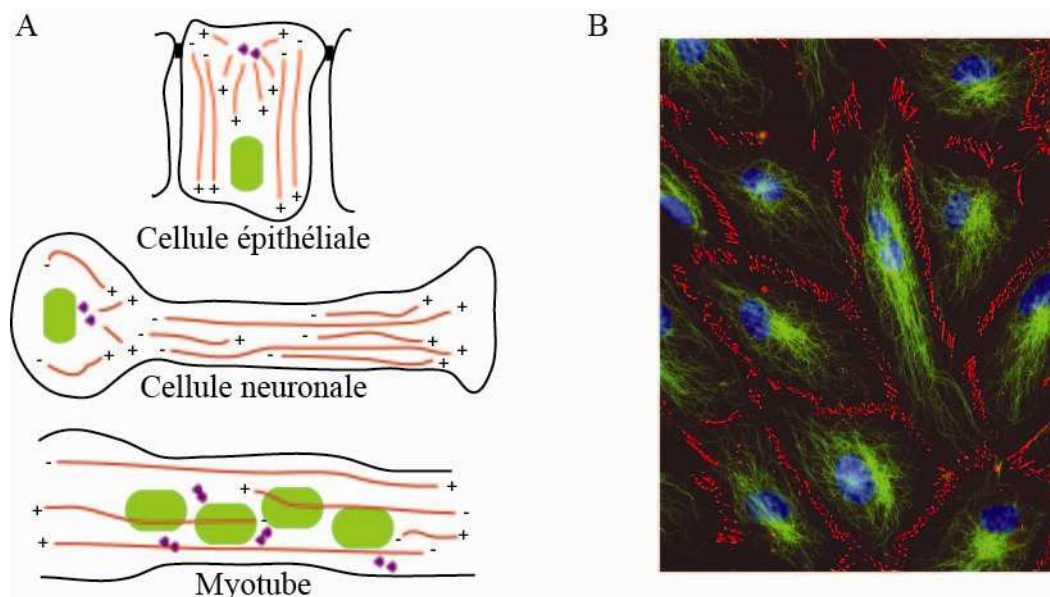


Figure 20 : Organisation des microtubules

(A) Organisation des microtubules hors des centrosomes dans trois types cellulaires spécialisés. L'orientation des microtubules est indiquée par les extrémités « plus » (+) et « moins » (-). Dans les cellules épithéliales, les microtubules (hors des centrosomes) sont orientés du pôle apical (-) vers le pôle basal (+). Les cellules neuronales possèdent des microtubules qui courent le long de l'axone avec une polarité uniforme. Dans les myotubes, les microtubules n'ont pas d'organisation particulière, si ce n'est un alignement le long de l'axe du myotube. D'après (**Keating and Borisy, 1999**). (B) Marquage en immunofluorescence des microtubules (vert) et de la VE-cadhérine dans des HUVECs. (données du laboratoire, S.Bouillot)

Les cellules épithéliales présentent deux types de microtubules connectés aux points d'adhérence intercellulaire. Aux contacts intercellulaires, les premiers sont orientés verticalement, les extrémités - dirigées vers le pôle apical, les extrémités + vers le pôle basal (**Figure 20 A**) (**Keating and Borisy, 1999; Stehbens et al., 2009**). Les autres sont disposés de façon radiale, les extrémités + déployées vers les points d'adhérence de type cadhérines (**Figure 20 A**) (**Keating and Borisy, 1999; Stehbens et al., 2009**).

Dans ce contexte, l'organisation des microtubules se trouve modifiée et évolue au fur et à mesure que les cellules entrent en contact. D'autre part, l'accumulation périjonctionnelle des microtubules ne dépend pas de l' α -caténine mais plutôt de la desmoplakine, protéine des desmosomes. En effet, la perte d'expression de la desmoplakine empêche l'accumulation périjonctionnelle des microtubules (**Lechler and Fuchs, 2007**). Ceci suggérerait que les microtubules seraient recrutés au niveau des contacts intercellulaires plutôt par les dispositifs d'adhérence de type desmosomes que par les cadhérines classiques (**Stehbens et al., 2009**). Or on sait que dans l'endothélium, les jonctions d'ancrage de type desmosomes n'existent pas mais que dans certains endothéliums des structures appelées « complexus adhaerentes » relient la VE-cadhérine et la desmoplakine (**Dejana, 2004; Zhou et al., 2004**). On peut donc penser que, dans le cas particulier des jonctions interendothéliales, le recrutement des microtubules se fasse par l'intermédiaire de la VE-cadhérine.

L'association VE-cadhérine/microtubules a encore suscité peu d'intérêt de la part de la communauté scientifique. Cependant, quelques études ont montré que, dans l'endothélium, le squelette de microtubules forme un réseau cytoplasmique (**Figure 20 B**) et joue un rôle important dans les réarrangements cellulaires (formation de fibres de stress, contractilité cellulaire, trous dans les jonctions...) en réponse à certains agents perméabilisants. En outre, il a été montré que la thrombine induit une déstabilisation des microtubules par la voie des MAP kinases 38 ou par la voie Rho. Coordinée avec le réarrangement du cytosquelette d'actine, la déstabilisation des microtubules est à l'origine du remaniement de l'endothélium suite à l'action de la thrombine (**Birukova et al., 2004; Gorovoy et al., 2005**). De la même manière, il a été montré que la déstabilisation des microtubules par le TNF α est responsable du remaniement du cytosquelette d'actine et de la perturbation de la VE-cadhérine, aboutissant ainsi aux effets bien connus du TNF à savoir une augmentation de la perméabilité interendothéliale (**Petrache et al., 2003**).

b. Les filaments intermédiaires

➤ Généralités sur les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont l'un des trois composants du cytosquelette. Ces filaments sont qualifiés d'intermédiaires à cause de leur diamètre (8-12 nm) qui est intermédiaire entre celui des microtubules (25 nm) et celui des microfilaments d'actine (5-8 nm). Contrairement aux microtubules et aux microfilaments d'actine qui résultent de l'assemblage de protéines globulaires, les filaments intermédiaires sont composés de protéines fibrillaires. Actuellement, la famille de protéines des filaments intermédiaires compte 70 membres qui s'assemblent en polymères de différentes protéines pour donner naissance à 5 sous-types de filaments intermédiaires (**Iwatsuki and Suda, 2010**). Les protéines des filaments intermédiaires sont principalement classées en cinq groupes en fonction des similarités de séquences en acides nucléiques et en acides aminés. Les kératines se répartissent en kératines de types I (acides) et II (basiques ou neutres). Le type III est composé de protéines homo polymériques : vimentine et protéines apparentées (desmine, périphérine, protéine fibrillaire acide gliale). Le type IV regroupe les protéines des neurofilaments, le type V les lamines localisées au niveau de l'enveloppe nucléaire (**Iwatsuki and Suda, 2010**).

Contrairement aux protéines des filaments d'actine et des microtubules qui ont une forte homologie de séquences, l'homologie de séquence des protéines des filaments intermédiaires n'excède parfois pas les 20%. Malgré cette faible homologie des séquences, ces protéines ont en commun un domaine central chargé négativement très conservé et des extrémités N- et C-terminales chargées positivement qui varient beaucoup en longueur et en composition en acides aminés (**Minin and Moldaver, 2008**). Le contrôle de la polymérisation est un point clé de la régulation structurelle et fonctionnelle des filaments du cytosquelette. Une fois synthétisés, les filaments intermédiaires sont relativement stables. Il n'existe à ce jour aucun nucléateur des filaments intermédiaires connu qui favoriserait la polymérisation. Cependant le turn-over est assuré par le protéasome dont l'activité est contrôlée par des phénomènes de phosphorylation et d'ubiquitination (**Kim and Coulombe, 2007**).

Les principales fonctions associées aux filaments intermédiaires sont généralement basées sur leurs propriétés mécaniques et d'auto-assemblage qui agissent pour maintenir l'intégrité cellulaire et tissulaire. Une autre fonction attribuée aux filaments intermédiaires concerne leur rôle dans la distribution/organisation des organelles, l'adhésion et la migration cellulaire, la méchanotransduction, la signalisation cellulaire (**Kim and Coulombe, 2007; Minin and Moldaver, 2008; Qin et al., 2010**). Les filaments intermédiaires sont capables

d'assurer tous ces rôles grâce à leur distribution subcellulaire. Sept types de réseaux ont été recensés, chacun étant relié à une fonction particulière (**Figure 21**): réseau apical (contacts intercellulaire, polarisation de la cellule), réseau périphérique (forme de la cellule, contacts cellule-cellule et cellule-matrice), réseau associée aux granules, réseau associée au Golgi (maintien de cette structure complexe), réseau juxta-nucléaire (transduction du signal intracellulaire, maintien du noyau), réseau radial (transduction du signal intracellulaire), réseau cytoplasmique (forme de la cellule, stockage et distribution des organelles) (**Iwatsuki and Suda**).

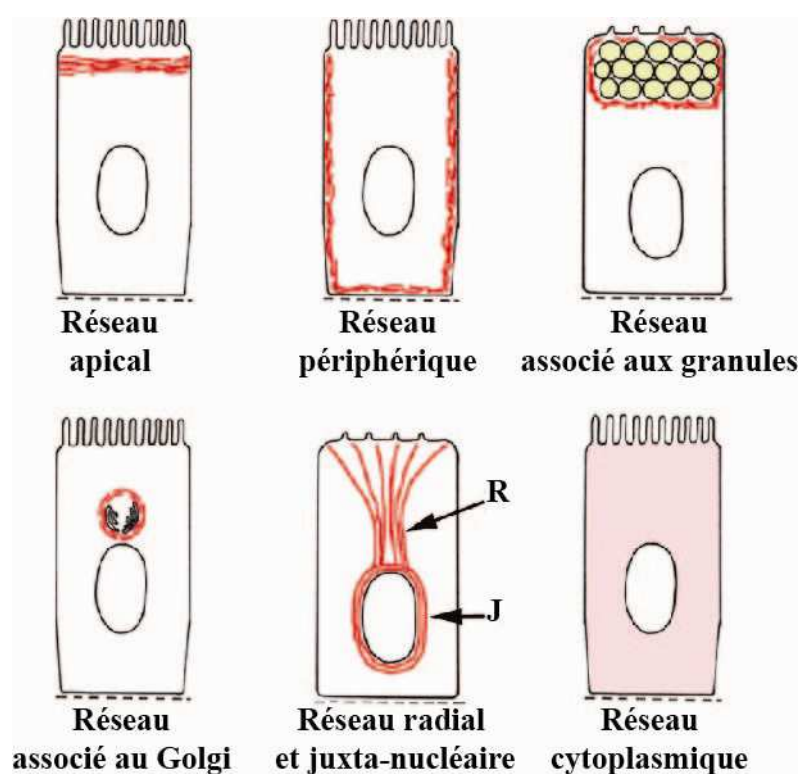


Figure 21 : Distribution subcellulaire des filaments intermédiaires

Ce schéma recense les sept types de distributions des filaments intermédiaires. Il existe : un réseau apical sous la membrane du pôle apical de la cellule, un réseau périphérique sous la membrane basolatérale, un réseau associé aux granules de sécrétion, un réseau qui entoure l'appareil de Golgi, un réseau radial qui part de la région périnucléaire et va jusqu'à la membrane, un réseau juxtanucléaire à la périphérie du noyau et enfin un réseau cytoplasmique qui s'étend dans tout le cytoplasme. D'après (**Iwatsuki and Suda, 2010**).

A titre anecdotique, en 2010, un travail de synthèse bibliographique a proposé de voir les filaments intermédiaires comme des protéines du stress cellulaire. En effet, les protéines des filaments intermédiaires ont de nombreux points communs avec les Heat Shock Protéines

(HSP) : l'abondance des protéines, une expression augmentée en réponse à différents stress, une fonction cytoprotectrice. De plus, les mutations des protéines des filaments intermédiaires ou celles des HSPs sont retrouvées dans les mêmes types de pathologies (**Toivola et al., 2010**).

➤ **Les filaments intermédiaires éléments de la jonction interendothéliale**

Le rôle des filaments intermédiaires dans le renforcement des jonctions intercellulaires est peu connu. Cependant, les filaments intermédiaires par l'intermédiaire de la desmoplakine sont reliés aux desmosomes et participent donc à la robustesse des tissus (**Green et al., 2010**). Par une stratégie de KO inducible, bloquant l'expression de la desmoplakine, et en association avec l'utilisation de Latrunculine A, réactif capable de provoquer la dépolymérisation de l'actine, il a été montré que les filaments intermédiaires participent au renforcement des jonctions intercellulaires et de plus qu'ils interagissent en synergie avec le cytosquelette d'actine (**Huen et al., 2002**).

Malgré l'absence de desmosomes dans les cellules endothéliales, la présence de desmoplakine, protéine des jonctions desmosomales, a pu être mise en évidence dans des cultures de cellules endothéliales issues de la veine ombilicale (HUVEC) au niveau des jonctions adhérentes intercellulaires (**Valiron et al., 1996**). En outre, il a été démontré que la VE-cadhérine recrute la desmoplakine au niveau des jonctions intercellulaires par l'intermédiaire de la plakoglobine (**Kowalczyk et al., 1998**). De même, la protéine p0071 en s'associant au domaine juxtamembranaire de la VE-cadhérine et à la desmoplakine assurerait également la connexion aux filaments intermédiaires (**Calkins et al., 2003; Hofmann et al., 2009**). Les filaments intermédiaires, dans les modèles endothéliaux, sont constitués de microfilaments de vimentine (**Kowalczyk et al., 1998; Valiron et al., 1996**). Ce type de jonctions faisant intervenir des protéines desmosomales (desmoplakine, plakoglobine) pour attacher la VE-cadhérine aux filaments intermédiaires mais ne répondant pas à la définition des desmosomes a été dénommé « complexus adhaerentes » (**Dejana, 2004**).

c. Les filaments d'actine

Les microfilaments d'actine sont constitués de monomères d'actine, protéine globulaire de 42 kDa très abondante et ubiquitaire (G-actine). Les monomères d'actine s'assemblent en structures filamenteuses (F-actine) qui orchestrent une grande variété de processus cellulaires : détermination de la forme cellulaire, motilité, adhésion et différenciation ... Il existe 3 isoformes d'actine, dénommées α , β et γ . L'actine α est spécifique

des tissus musculaires et est le principal constituant de l'appareil contractile, tandis que les isoformes β et γ co-existent dans la plupart des types cellulaires et participent aux microfilaments d'actine.

Dans l'organisme, les cellules doivent être capables de sonder leur environnement, de se déformer, de se mouvoir et de se diviser pour assurer leurs propres fonctions. L'actine est l'acteur principal qui permet aux cellules d'assurer ces fonctions vitales grâce à sa capacité dynamique d'assemblage et de désassemblage en structures tridimensionnelles. Comment ces structures moléculaires se mettent en place pour répondre à autant de fonctions ? C'est ce à quoi nous essaierons de répondre dans le prochain paragraphe consacré au cytosquelette d'actine.

2. Zoom sur le cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine est un partenaire important des jonctions adhérentes et donc de la VE-cadhérine, c'est pourquoi nous lui consacrerons ce paragraphe. Néanmoins la relation entre cytosquelette d'actine et jonctions adhérentes ne sera pas abordée ici mais dans une partie ultérieure consacrée à une vision dynamique de la jonction adhérente et dont le cytosquelette d'actine est l'acteur principal. Le cytosquelette est un vaste sujet. Aussi, ce paragraphe a pour but de fixer les connaissances de base concernant le cytosquelette d'actine et restera de ce fait succinct.

a. Dynamique du cytosquelette d'actine

Les filaments d'actine sont des structures flexibles et labiles, qui s'assemblent et se désassemblent selon une dynamique complexe qui leur permet de répondre aux besoins de nombreuses fonctions cellulaires comme la motilité et la division cellulaire. Pour ce faire, les filaments d'actine sont liés à diverses protéines « accessoires » qui activent/inhibent leur élongation, induisent leur scission, les relient entre eux ou à d'autres structures comme la membrane.

➤ Polymérisation de l'actine

L'actine est une protéine qui existe sous deux formes : globulaire (G-actine), à l'état de monomère et filamenteuse (F-actine), à l'état de polymères. Pour être stabilisée, la G-actine est complexée à une molécule d'ATP et à un cation divalent qui pourra être échangée lors de la polymérisation. Les monomères de G-actine s'assemblent et s'enroulent pour former une structure hélicoïdale de 5-9 nm de diamètre. La réaction de polymérisation

s'accompagne de l'hydrolyse de l'ATP en ADP + Phosphate à chaque incorporation de monomère de G-actine (**Figure 22 étape 10**) (Pollard et al., 2000). Bien que l'hydrolyse de l'ATP ne soit pas indispensable à la polymérisation, il faut noter que la G-actine-ATP s'incorpore plus vite au filament que la G-actine-ADP.

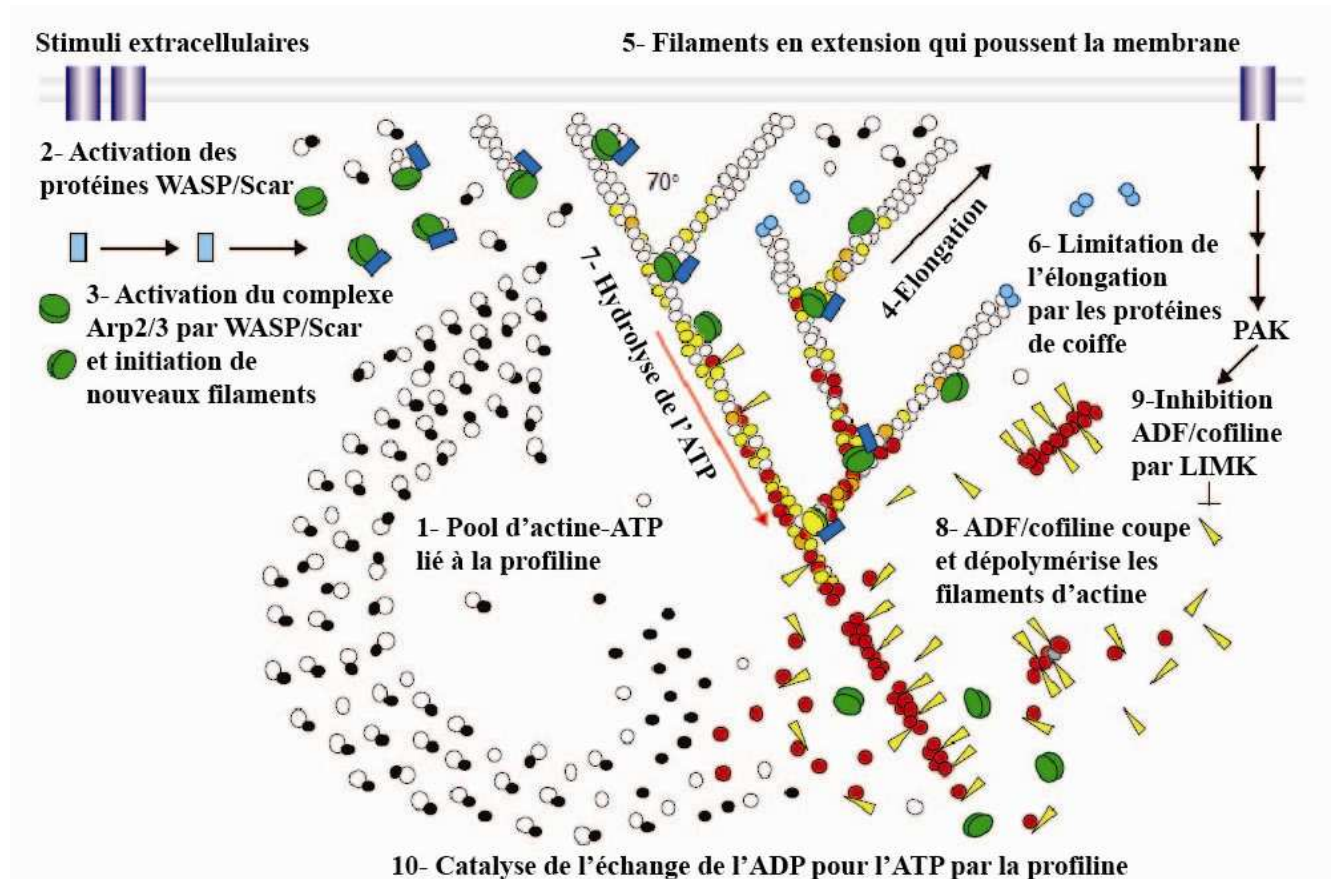


Figure 22 : Dynamique du cytosquelette d'actine

Modèle d'assemblage des microfilaments d'actine dont les chiffres se rapportent aux différentes étapes chronologiques de la dynamique du cytosquelette d'actine à l'extrémité d'une cellule en mouvement. D'après (Pollard and Beltzner, 2002).

Les monomères d'actine ont une structure asymétrique qui donne, après empilement, un filament d'actine polaire. Cette asymétrie se retrouve dans les cinétiques de polymérisation aux deux extrémités : l'extrémité (+) ou « barbée » polymérise plus rapidement que l'extrémité (-) ou « pointue » (Campellone and Welch, 2010). Pour polymériser, la concentration en monomères disponibles doit être supérieure à une concentration critique. Cependant, il faut noter que cette concentration critique à l'extrémité pointue ($\approx 0,6 \mu\text{M}$) est plus importante qu'à l'extrémité barbée ($\approx 0,1 \mu\text{M}$). A l'état d'équilibre, la longueur du filament reste donc constante : autant de monomères peuvent s'ajouter à l'extrémité (+) que

d'autres se perdent à l'extrémité (-). Ce phénomène est appelé treadmilling ou effet tapis roulant (**Le Clainche and Carlier, 2008**).

➤ **Contrôle de la polymérisation de l'actine**

S'il n'existait pas de protéines contrôlant la polymérisation de l'actine, celle-ci resterait dans un état stationnaire et ne permettrait pas au cytosquelette d'être dynamique et d'exercer toutes ses fonctions. La dynamique du cytosquelette d'actine est un processus très complexe en raison des nombreuses protéines qui sont capables d'interagir avec l'actine ou ABP (Actin Binding Protein). Ces protéines contrôlent la polymérisation de l'actine de différentes manières : en favorisant la nucléation (Arp2/3, formines), en séquestrant les monomères d'actine-G (thymosine, profiline), en « coiffant » les extrémités des filaments (CAP) ou en les fragmentant (cofiline, gelsoline).

➤ **Les facteurs de nucléation/d'élargissement**

Les principaux nucléateurs de l'actine sont le complexe Arp2/3 et les formines. Le complexe Arp2/3 est constitué de l'assemblage de sept protéines : Arp2, Arp3 et cinq protéines ARPC (Actin Related Protein Complex). Il favorise la création de nouveaux filaments d'actine à partir d'un filament pré-existant en créant un nouveau branchement au niveau d'une extrémité barbée. L'activité du complexe Arp2/3 à elle seule ne suffit pas à créer des filaments d'actine ramifiés. Les protéines de la famille WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein) lui viennent en aide comme inducteur de la polymérisation (**Figure 22 étapes 2 et 3**) (**Pollard, 2007**). Quant aux formines, elles sont caractérisées par des domaines FH (Formin Homology), FH1 et FH2. Elles interagissent avec l'extrémité barbée par leur domaine FH2 et empêchent d'autres protéines de venir stopper l'élargissement (**Campellone and Welch, 2010; Pollard, 2007**).

➤ **Les protéines de séquestration**

Un des paramètres importants qui contrôle la polymérisation de l'actine est la disponibilité de monomère d'actine-G. Les protéines de séquestration servent à réguler la quantité d'actine G présente dans le cytoplasme. Les principales protéines de séquestration sont la thymosine $\beta 4$ et la profiline. Ces dernières se fixent sur l'actine-G monomérique, la séquestrent, l'empêchant ainsi de s'assembler en filament (**Figure 22 étape 1**). Cependant, alors que la thymosine $\beta 4$ empêche l'ADP d'être remplacé par une molécule d'ATP, la profiline stimule l'échange ADP en ATP (**Pollard et al., 2000**). Or comme nous l'avons vu l'actine-G-ATP s'incorpore plus rapidement aux filaments. Le rôle de la profiline est donc

quelque peu paradoxal puisqu'elle séquestre les monomères pour empêcher leur incorporation mais favorise en même temps la formation de monomères liés à l'ATP pour faciliter leur incorporation (Yarmola and Bubb, 2009).

➤ Les protéines de coiffage

Comme leur nom l'indique, les protéines de coiffage viennent se fixer sur les extrémités des filaments d'actine et empêchent ainsi leur élongation. Si les extrémités barbées étaient libres en permanence, l'élongation des filaments appauvrirait très rapidement le pool de monomères d'actine cytosolique. Le nombre d'extrémités barbées libres doit donc être limité (**Figure 22 étape 6**). C'est la fonction exercée par les protéines de coiffage telles que CapZ, tropomoduline et gelsoline (Pollard et al., 2000).

➤ Les protéines de fragmentation

La dépolymérisation spontanée de l'actine est un phénomène lent qui ne permet pas d'expliquer le « turnover » d'actine observé *in vivo*. Deux mécanismes permettent d'accélérer ce turnover : la dépolymérisation et la fragmentation des filaments (**Figure 22 étape 8**). Deux familles de protéines sont responsables de ces mécanismes : les gelsolines, et les ADF/cofilines (Actin Depolymerizing Factors). La famille des gelsolines exerce une double activité : 1- en s'associant avec le filament d'actine, la gelsoline le fragilise et induit sa fragmentation 2- après fragmentation, la gelsoline coiffe l'extrémité barbée tandis que l'extrémité pointue se dépolymérise (Ono, 2007). Contrairement à la famille des gelsolines, les ADF/cofilines n'exercent pas l'activité de coiffage, elles se fixent sur l'actine et induisent un changement conformationnel qui rompt le filament d'actine (Ono, 2007).

b. Les différentes fonctions du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine a, comme il a déjà été mentionné, de nombreuses fonctions dans la cellule. Plus particulièrement, il organise et structure les cellules, il est acteur du transport cellulaire et permet aux cellules de se mouvoir.

➤ Structuration de la cellule

Comme le corps humain et son squelette osseux, la cellule possède le cytosquelette d'actine. En effet, les différentes structures d'actine présentes dans la cellule sont en contact étroit avec la membrane cellulaire et les organites (Wirtz and Khatau, 2010). Dans la cellule, les filaments d'actine se trouvent dans les protrusions membranaires (filopodes, lamellipodes), dans le cytoplasme et autour du noyau (Vartiainen, 2008; Wirtz and Khatau,

2010) (Figure 23). Ces différentes populations de F-actine permettent à la cellule d'avoir la forme qui convient à sa fonction. Pour illustrer ceci, on peut prendre l'exemple des microvillosités intestinales. Pour assurer leur fonction d'absorption, les cellules intestinales possèdent à leur surface apicale des microvillosités en forme de brosse qui leur confèrent une grande surface d'échange. Ces microvillosités sont de fins prolongements cellulaires composés de filaments d'actine rattachés entre eux (**Athman et al., 2002**). Par ailleurs, dans l'endothélium, tissu composé de cellules pavimenteuses, le cytosquelette s'organise en une structure corticale sous la membrane appelée ceinture d'adhésion (**Prasain and Stevens, 2009**).

La raison pour laquelle différentes populations d'actine co-existent à l'intérieur d'une seule et même cellule ou varient d'un type cellulaire à l'autre vient du fait que les filaments d'actine interagissent avec de nombreuses protéines dites « accessoires » et plus communément appelées « Actin Binding Protein » ABP. En interagissant de manière transitoire avec ces différentes protéines, le cytosquelette d'actine peut changer d'architecture et se présenter sous forme de faisceaux contractiles, de faisceaux parallèles ou de maillage (**Figure 23**).

➤ **Transport intracellulaire**

Les filaments d'actine participent au transport intracellulaire soit en favorisant le transport vésiculaire soit en servant de rails mécaniques utilisés pour le déplacement de protéines cargo.

L'actine est étroitement liée au phénomène d'endocytose qui nécessite un remodelage du cytosquelette d'actine pour initier le mouvement d'invagination de la membrane plasmique (**Doherty and McMahon, 2009**). Des études ont montré que bon nombre d'ABP (Arp2/3, WASP) sont recrutées aux sites d'endocytose et reliées aux protéines impliquées dans l'endocytose comme la clathrine, ce qui tend à prouver l'implication du cytosquelette d'actine (**Galletta et al., 2010; Merrifield, 2004; Pollard and Cooper, 2009**). Si la participation du cytosquelette d'actine à l'endocytose ne fait aucun doute, la chronologie des événements reste à élucider.

Au cours de ces dernières années, les techniques d'imagerie ont beaucoup été utilisées pour visualiser et comprendre la séquence d'événements qui relie l'endocytose à la polymérisation de l'actine. Les conclusions qui se dégagent de ces recherches récentes suggèrent que la polymérisation de l'actine est étroitement liée aux mouvements et aux changements de géométrie qui accompagnent le processus d'endocytose (notamment

l'endocytose clathrine dépendante dans les cellules mammifères) (Pollard and Cooper, 2009).

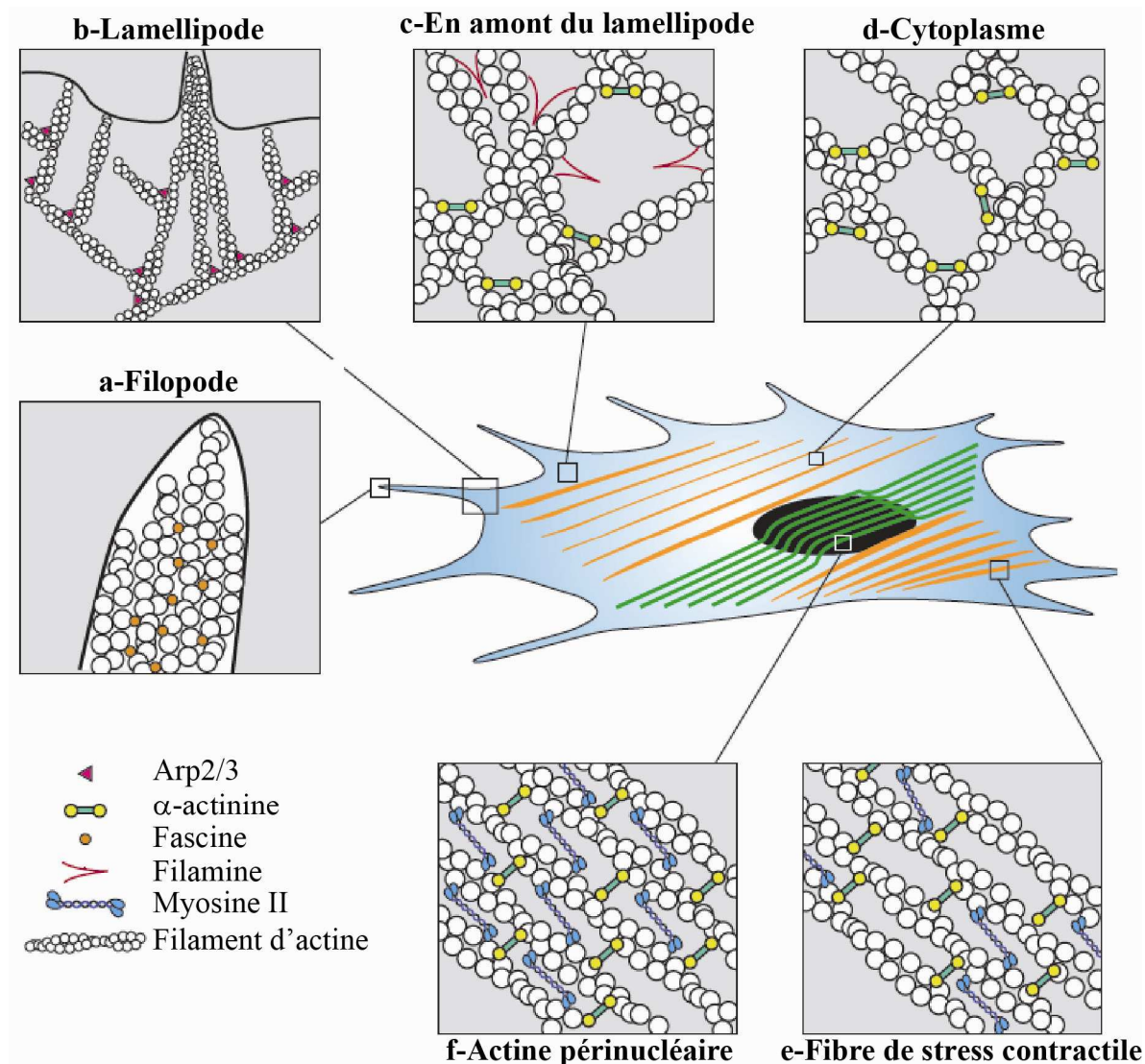


Figure 23 : Organisation des filaments d'actine dans différentes régions de la cellule

A l'extrémité de la cellule, les filopodes (a) sont constitués de faisceaux d'actine parallèles maintenus par la fascine tandis que les lamellipodes (b) sont formés d'un réseau d'actine dendritique nucléé par le complexe Arp2/3. En amont de l'extrémité du lamellipode (c), le réseau d'actine forme un maillage de faisceaux orthogonaux entrelacés. Dans le cytoplasme (d), les filaments d'actine sont réticulés en réseaux de faisceaux orthogonaux grossiers élastiques mais non contractiles, car dépourvus de myosine II. A la surface basale de la cellule (e), les filaments d'actine forment un réseau de fibres de stress contractiles contenant la protéine motrice Myosine II. A la surface apicale, au dessus du noyau (f), les filaments s'organisent en un réseau très compact et contractile de faisceaux parallèles qui forme une coiffe autour du noyau. D'après (Wirtz and Khatau, 2010).

D'autre part, lorsque l'endocytose est initiée, on observe un recrutement concomitant de protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine comme Arp2/3 et ses activateurs.

Par la suite, après scission de la membrane et libération de la vésicule d'endocytose, la polymérisation de l'actine continue pour diriger et déplacer la vésicule (**Merrifield, 2004**).

Par ailleurs, le réseau d'actine sert également de rails pour le transport intracellulaire d'organelles et de complexes moléculaires. Pour cela, les cellules eucaryotes mettent en jeu les myosines, moteurs moléculaires qui utilisent les filaments d'actine comme rails pour se déplacer (**Pollard and Cooper, 2009**). Les myosines utilisent l'énergie de l'ATP pour se déplacer sur les fibres d'actine. Il a été montré que ce sont principalement les myosines de classe I et V qui sont responsables du trafic des organelles. De plus, l'activité des myosines serait couplée à une activation de polymérisation/dépolymérisation de l'actine lorsqu'elles déplacent leur cargo moléculaire afin de construire au fur et à mesure les rails qui leur permettent de se déplacer (**Cramer, 2008**).

➤ **Motilité et contractilité**

L'actine est un élément essentiel de la motilité cellulaire. Que ce soit les cellules immunitaires pour atteindre les pathogènes, les cellules cancéreuses pour se disséminer ou encore les cellules endothéliales pour réparer une blessure, les cellules ont besoin de se mouvoir. Il existe deux types de motilité basées sur le cytosquelette d'actine : la motilité dirigée par la polymérisation de l'actine et la motilité dirigée par l'actomyosine (**Vartiainen, 2008**). La migration des cellules résulte de l'assemblage de filaments d'actine à l'avant de la cellule et de la rétractation du cytosquelette d'actine à l'arrière de la cellule (**figure 24 C**) (**Pollard and Cooper, 2009**).

L'assemblage des filaments d'actine à partir des monomères peut suffire à changer la forme de la cellule et à produire une protrusion membranaire (filopode ou lamellipode) qui est souvent la première étape dans le processus de locomotion. Le complexe Arp2/3 assemble les filaments d'actine en un réseau branché comme les rameaux d'un buisson. Chaque filament développe une force de quelques piconewton, qui, au voisinage de la membrane permettent à l'extrémité avant de la cellule d'avancer (**Pollard and Borisy, 2003**). A l'arrière de la cellule, la myosine II génère des forces au sein des filaments d'actine et produit des contractions qui tirent l'arrière de la cellule (**Pollard and Cooper, 2009**) (**Figure 24 C**). En effet, la myosine II est le principal moteur moléculaire qui régit la contractilité actomyosine dans les cellules musculaires et non musculaires. La myosine II est un complexe protéique hexamérique composé de : deux chaînes lourdes où se trouvent un domaine moteur très conservé et un domaine superhélicoïdal (coiled-coil), deux chaînes légères dites de « régulation » qui régissent l'activité ATPase et enfin deux chaînes légères dites

« essentielles » qui confèrent l'intégrité structurale du domaine moteur (**Figure 24 A**). La contraction actomyosine a lieu après assemblage de deux myosines II en filament bipolaire et association de leurs domaines moteurs avec deux filaments d'actine orientés de manière opposée (**Figure 24 B**). L'activation du domaine moteur tire les filaments d'actine ensemble (**Figure 24 B**, traction dans le sens des flèches) et produit les forces de traction actomyosine à l'origine de la contractilité cellulaire (**Clark et al., 2007**).

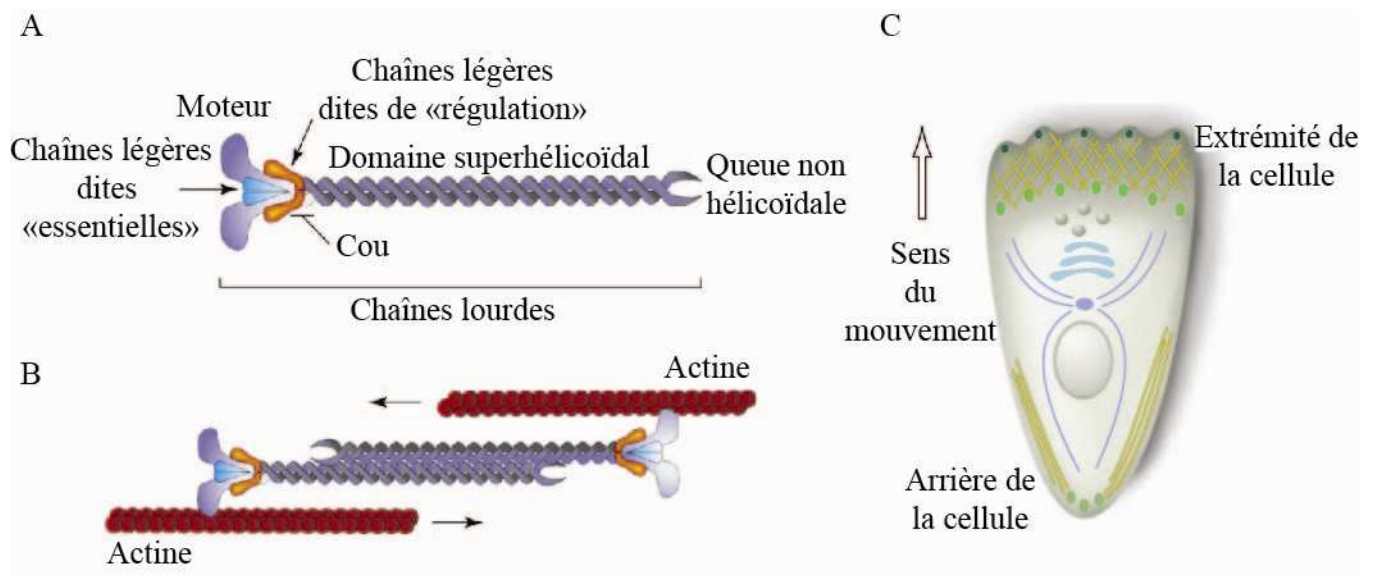


Figure 24 : Mécanismes à la base de la contractilité cellulaire ou complexe actomyosine

(A) Représentation schématisée d'un monomère de myosine II. La chaîne lourde comprend un domaine moteur, un cou, un domaine superhélicoïdal et un domaine non hélicoïdal. D'après (**Clark et al., 2007**). (B) Les extrémités C-terminales de deux monomères de myosine II s'assemblent en filament bipolaire et interagissent avec la F-actine par leurs extrémités N-terminales. L'activation du domaine moteur de la myosine II provoque la traction des filaments d'actine (dans le sens des flèches) et conduit aux tensions contractiles. D'après (**Clark et al., 2007**). (C) Locomotion d'une cellule par assemblage de filaments d'actine à l'avant de la cellule et rétraction des filaments d'actine à l'arrière de la cellule. D'après (**Pollard and Cooper, 2009**).

c. Coopération actine/Rho GTPases

➤ Les Rho GTPases

La famille Rho des petites protéines G apparentées à la superfamille des protéines Ras monomériques compte plus d'une dizaine de membres dont les plus connus sont Rho, Rac et Cdc42 (Ridley, 2006). Ces protéines fixent le GTP et l'hydrolysent en GDP. Ce sont des interrupteurs moléculaires de la signalisation intracellulaire. En effet, celles-ci oscillent entre un état actif lié au GTP, localisé spécifiquement à la membrane plasmique ou dans certains compartiments cellulaires, et un état inactif cytosolique lié au GDP (**Figure 25**) (**Etienne-**

Manneville and Hall, 2002). Afin de cibler leur action à la membrane, les Rho GTPases subissent des modifications post-traductionnelles (géranylation, farnésylation) qui leur permettent d'interagir avec la membrane de façon très localisée (**Ridley, 2006**).

Les principaux régulateurs des Rho GTPases sont (**Cherfils and Pacaud, 2004; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Ridley, 2006**) :

- les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) : ils stimulent le relargage du GDP permettant ainsi l'accrochage du GTP
- les GAPs (GTPase Activating Proteins) : elles catalysent l'hydrolyse du GTP et laissent les Rho GTPases dans leur conformation inactives
- les Rho GDIs (Rho GDP Dissociation Inhibitor) : ils se lient aux GTPases Rho et les inhibent soit les empêchent de se lier à la membrane en masquant le site géranylé ou farnésylé, soit en les empêchant d'interagir avec leurs effecteurs.

Dans leur conformation liée au GTP, les Rho-GTPases activent leurs effecteurs. Les Rho GTPases sont principalement impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine.

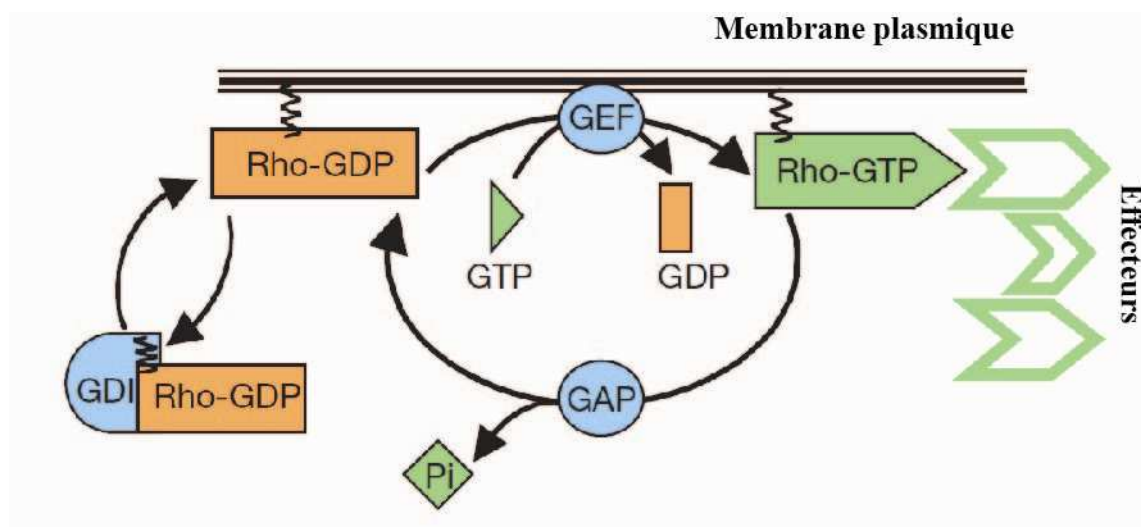


Figure 25 : Cycle des Rho-GTPases

Les Rho-GTPases oscillent entre une conformation active (liée au GTP) et une conformation inactive (liée au GDP). A l'état activé, elles interagissent avec des protéines « cible » effectrices. Le cycle est finement régulé par trois classes de protéines : les facteurs d'échange GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui catalysent l'échange de nucléotide, les protéines activatrices GAPs (GTPase Activating Proteins) qui stimulent l'hydrolyse du GTP et inactivent les Rho-GTPases et enfin les inhibiteurs des facteurs d'échange GDIs (Guanine nucleotide Exchange Inhibitors) qui extraient les GTPases des membranes. D'après (**Etienne-Manneville and Hall, 2002**).

➤ L'action des Rho GTPases sur le cytosquelette d'actine

Les GTPases de la famille Rho contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires (cycle cellulaire, trafic vésiculaire, transduction de signaux régulateurs de la transcription ou encore production de messagers secondaires) car leurs effecteurs sont nombreux (**Etienne-Manneville and Hall, 2002; Jaffe and Hall, 2005**). Néanmoins, les GTPases Rho sont surtout reconnues pour leur rôle dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine (**Etienne-Manneville and Hall, 2002; Ridley, 2006**). En effet celles-ci ont la capacité de contrôler la forme, l'attachement et la mobilité des cellules.

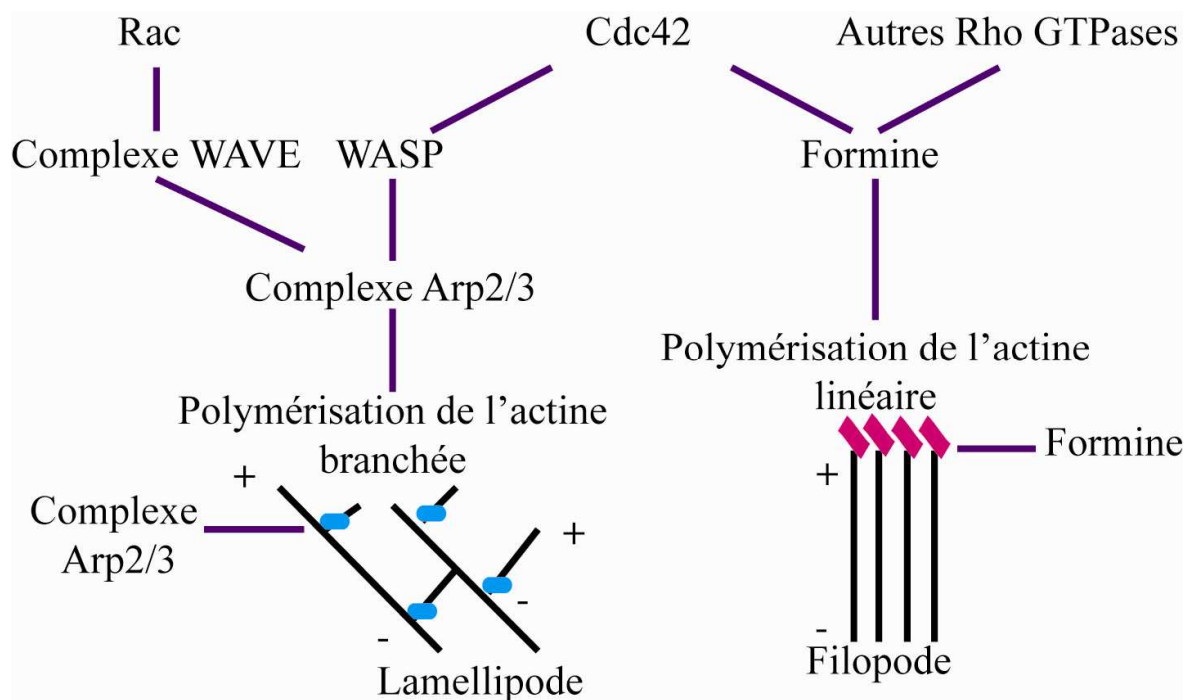


Figure 26 : Contribution des GTPases de la famille Rho à la dynamique du cytosquelette d'actine

A la membrane, les GTPases de la famille Rho stimulent les protrusions membranaires régies par la polymérisation de l'actine. Elles régulent les deux types de réseaux d'actine : branché et linéaire. Les protéines Rac et Cdc42 activent les protéines de la famille WASP (Wiscott-Aldrich Protein Syndrome) et WAVE (WASP-family VErprolin-homologous protein) qui, en retour, activent le complexe Arp2/3. Se produit alors un réseau d'actine branchée à l'origine de la formation de lamellipodes. Les autres protéines de la famille Rho et Cdc42 activent les formines qui se lient à l'extrémité + des filaments d'actine et induisent la polymérisation de faisceaux d'actine parallèles au niveau de la membrane plasmique, formant ainsi des filopodes. D'après (**Ridley, 2006**).

Il est maintenant admis que Rac et Cdc42, Rac et Rho ont chacune leurs spécificités résumées sur la **Figure 26** :

- Cdc42 est impliqué dans la formation de filopodes qui sont de longues extensions très fines de la membrane. Cdc42 stimule la polymérisation de l'actine en impliquant les protéines de la famille WASP et le complexe Arp2/3 et peut également induire la nucléation de l'actine en activant les formines (**Ridley, 2006**).
- Rac provoque la polymérisation de l'actine au niveau de la membrane plasmique, créant ainsi des protrusions membranaires appelées lamellipodes.
- Rho activé induit la formation de fibres de stress et de points d'adhésion focaux permettant l'ancrage des cellules à leur matrice.

Rho, Rac et Cdc42 et plus largement les GTPases de la famille Rho interviennent dans la biologie de la cellule endothéliale. Elles contribuent notamment à la réponse cellulaire de l'endothélium aux contraintes de cisaillement du flux sanguin. En effet, il a été montré que des cellules endothéliales subissant des forces de cisaillement s'alignent dans le sens du flux sanguin grâce à un réarrangement du cytosquelette d'actine en partie régulé par l'action des GTPases. Il semblerait que Rho soit inactivé dans une première phase et provoque le désassemblage des fibres de stress. Dans un second temps, la réactivation de Rho provoquerait l'assemblage de nouvelles fibres de stress alignées dans le sens du flux grâce à l'élévation de Rac activé à l'avant de la cellule (**Tzima, 2006**).

D'autre part, l'endothélium est un tissu dynamique dont les cellules se contractent, modulent l'ouverture des jonctions intercellulaires et ce, plus particulièrement au cours de la transmigration leucocytaire (**Millan and Ridley, 2005**). Cdc42 est surtout impliqué dans la stabilisation des jonctions adhérentes et la restauration de la perméabilité alors que Rho et plus précisément RhoA est impliqué dans la voie de signalisation de la contraction actomyosine décrite dans la **Figure 27 (Broman et al., 2007)**. Une étude a mis en évidence le rôle de Cdc42 dans la régulation de la perméabilité vasculaire. En effet, les résultats indiquent que Cdc42 contrôle l'interaction entre β -caténine et α -caténine et par conséquent l'assemblage du complexe VE-cadhérine/caténines avec le cytosquelette d'actine (**Broman et al., 2006**). Alors que la thrombine induit l'activation rapide de RhoA (en moins d'une heure), l'activation de Cdc42 est plus tardive. L'activation de RhoA provoque dans un premier temps la rétraction des cellules en favorisant la contraction actomyosine et la dissociation des jonctions. Ensuite, l'activation de Cdc42, provoque la restauration de la perméabilité endothéliale en facilitant l'association de la VE-cadhérine avec l' α -caténine et par conséquent la stabilité des jonctions adhérentes (**Broman et al., 2007**).

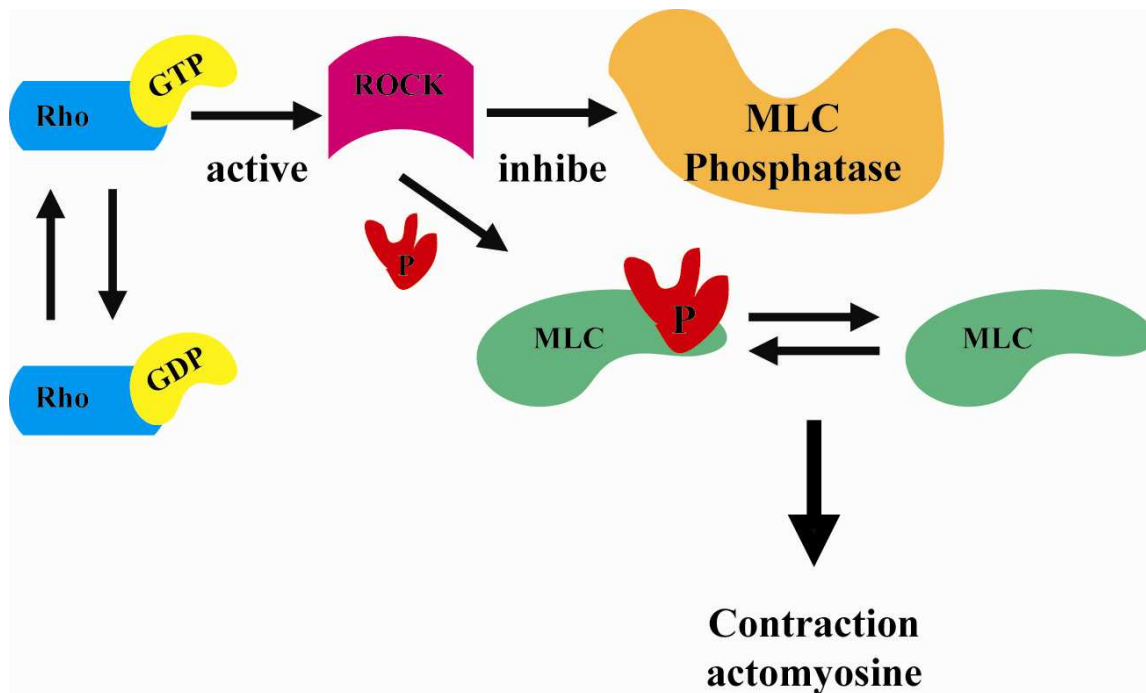


Figure 27 : Contraction actomyosine dépendant de Rho

Rho, dans sa forme « active » liée au GTP active ROCK (Rho kinase) qui a une action inhibitrice sur la MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase). En inhibant la MLCP, ROCK stimule la contraction actomyosine. En effet, la MLC (Myosin Light Chain) n'étant plus déphosphorylée, il n'y a plus de limitation de la contraction actomyosine. Par ailleurs, ROCK phosphoryle directement la MLC sur Sérine 19 et induit également la contraction actomyosine par ce biais là. D'après (**Pellegrin and Mellor, 2007**).

En résumé, les GTPases Rho sont particulièrement impliquées dans le maintien de la structure de l'endothélium soit en réponse au shear stress soit en réponse à la transmigration leucocytaire. Cependant, d'autres processus cellulaires, des plus simples (établissement de la polarité cellulaire) aux plus complexes (contraction des cellules musculaires lisses), font également intervenir l'activation des GTPases Rho et pas seulement Rho, Rac et Cdc42 (**Etienne-Manneville and Hall, 2002; Jaffe and Hall, 2005**).

III. Une approche dynamique de la jonction interendothéliale

A. Une idée émergente : sensibilité des jonctions intracellulaires à la mécano-transduction

1. Définition

Pour assurer le bon fonctionnement des différents organes, les cellules sont capables de communiquer entre elles grâce à des signaux chimiques et mécaniques. Des contraintes de cisaillements auxquelles est soumis l'endothélium vasculaire aux forces de tiraillements subies par les cellules des muscles squelettiques, toutes les cellules de notre corps sont soumises à des forces (**Orr et al., 2006**). La mécano-transduction est le phénomène qui permet à une cellule de percevoir une information mécanique au niveau de ses récepteurs membranaires (mécano-réception), de la transmettre (mécano-transmission) et d'apporter une réponse cellulaire proportionnelle à l'information perçue (mécano-activation) (**Vogel and Sheetz, 2006**).

Au sein d'une population de cellules, les interactions physiques sont de deux natures possibles : les interactions cellule-matrice extracellulaire et les interactions cellule-cellule. Elles s'exercent, respectivement, au niveau des adhérences focales et des jonctions intercellulaires. L'idée selon laquelle, ces structures ne sont pas figées mais sont, au contraire, des sites cruciaux de transmission des forces a été récemment souligné par les travaux de Maruthamuthu (**Maruthamuthu et al., 2011**). En effet la matrice extracellulaire et les cellules avoisinantes représentent le principal signal que peut percevoir une cellule pour établir et maintenir sa forme. C'est pourquoi, les cellules doivent pouvoir sentir les signaux mécaniques de leur environnement afin de modifier l'architecture de leur cytosquelette et de leur adhérence (**Vogel and Sheetz, 2006**). Pour l'heure, les principaux récepteurs membranaires impliqués dans la mécano-transduction sont les intégrines au niveau des plaques d'adhésion focale et les cadhérines au niveau des jonctions intercellulaires.

2. Généralités

Dans le phénomène de mécano-transduction, le couplage des complexes adhésifs au cytosquelette est un paramètre clé qui gouverne la réponse apportée par une cellule aux forces auxquelles elle est soumise (**Ko and McCulloch, 2001; Parsons et al., 2010**). Si les études se multiplient pour identifier les protéines impliquées dans l'ancrage au cytosquelette (cf. III.B.

La connexion cytosquelette / jonctions adhérentes), la contribution des forces mécaniques à l'établissement des jonctions et au remodelage des tissus en est à ses balbutiements.

De nombreuses études ont montré que l'augmentation des forces contractiles ou l'application de forces externes au niveau des points d'adhérence est capable de gouverner la dynamique des plaques d'adhérence focale (**Schwartz and DeSimone, 2008**). Suite à l'augmentation des forces, les intégrines recrutent, dans un premier temps, de nouveaux composants tels que la Zyxine et la Vinculine qui renforcent la liaison au cytosquelette d'actine (**Hirata et al., 2008; Schwartz and DeSimone, 2008**). De manière indirecte, les intégrines recrutent également des protéines d'échafaudage et régulatrices comme la paxilline et FAK (Focal Adhesion Kinase) qui en retour vont activer la voie des Rho GTPases et favorisent la contractilité cellulaire régie par la myosine II et la polymérisation de l'actine (**Parsons et al., 2010**). Enfin, les tensions engendrées au niveau des plaques d'adhérence focale induisent l'activation conformationnelle des intégrines qui augmente leur attachement à la matrice extracellulaire (**Katsumi et al., 2005**). Ainsi, les intégrines sentent les paramètres mécaniques de leur environnement et activent des voies de signalisation qui leur permettent de répondre de manière adaptée aux forces appliquées (**Schwartz, 2010**).

L'idée que les cadhérines puissent être le siège de mécano-transduction a longtemps été suspectée mais les études sur le sujet commencent seulement à émerger (**Smutny and Yap, 2010**). Cette hypothèse a notamment été étayée par différentes études qui ont montré que la contractilité cellulaire était un phénomène nécessaire à la bonne formation des jonctions adhérentes (**Brevier et al., 2008; Schwartz and DeSimone, 2008**). A ce jour, peu de données existent sur le lien qui existe entre cadhérines, forces et cytosquelette d'actine, néanmoins, ce sujet prend de plus en plus d'ampleur. Les premiers éléments concrets sur ce sujet ont été apportés par Le Duc en 2010. Pour tester la capacité des cadhérines à participer à la mécano-transduction au niveau des jonctions intercellulaires, des billes magnétiques, sur lesquelles sont greffés des fragments recombinants de E-cadhérine ont été mises en contact avec la surface de cellules F9. Les fragments recombinants de E-cadhérine ont interagi avec les cadhérines présentes à la surface des cellules F9. Une fois que les billes ont adhéré aux cellules, elles ont été soumises à un champ magnétique pour générer des forces (**le Duc et al., 2010**). En mesurant le déplacement des billes en réponse aux forces appliquées, il a été possible de calculer localement les changements de rigidité au niveau des contacts cadhérine/cadhérine générés par les billes (**Wang and Ingber, 1995**). Il a ainsi été démontré qu'en réponse à une stimulation mécanique, la rigidité des contacts E-cadhérine recombinante/cellule F9 augmente, révélant pour la première fois les capacités de mécano-

réception de la E-cadhérine. Cette étude a également mis en exergue un nouveau rôle de la vinculine dans la modulation de la mécanique du complexe E-cadhérine/cytosquelette d'actine et dans le remodelage des jonctions induit par l'application des forces externes. Cependant, cette étude n'a pas permis d'élucider le mécanisme moléculaire qui permet à la vinculine de participer à la mécano-transduction induite par la E-cadhérine (**le Duc et al., 2010**). En revanche, ces résultats peuvent être rapprochés d'une autre étude qui suggère que l' α -caténine est un mécano-transducteur des jonctions adhérentes. Plus précisément, il a été montré que suite à une tension exercée au niveau de l' α -caténine, celle-ci change de conformation démasquant ainsi un site de liaison qui permet le recrutement jonctionnel de la vinculine (**Yonemura et al., 2010**). En rassemblant les données de ces deux études, on peut suggérer que les tensions générées par la contraction du système actomyosine et les adhérences intercellulaires activent la liaison α -caténine/vinculine qui permet un ancrage au niveau du cytosquelette d'actine (**Figure 28**).

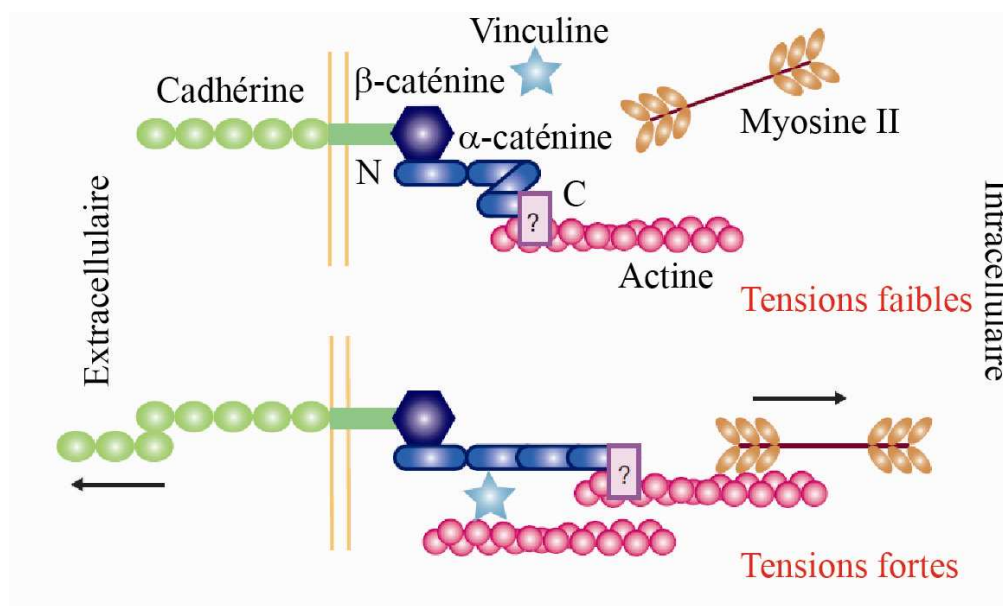


Figure 28 : Modèle d'activation de l' α -caténine par les forces mécaniques

Au repos, l' α -caténine est dans une conformation repliée qui masque certains sites d'interaction. En réponse aux tensions, l' α -caténine se déplie, démasque son site d'interaction pour la vinculine. Ce modèle n'exclut cependant pas l'existence d'autres liens entre l' α -caténine et l'actine. D'après (**Yonemura et al., 2010**).

3. Substrats microstructurés pour l'étude des forces engagées par les cellules

Les progrès technologiques et le développement de la nanofabrication permettent aujourd'hui d'étudier les mécanismes de mécano-transduction dans un environnement mécanique contrôlé. Ces techniques peuvent être appliquées à des cellules de type sauvage, déficientes en une protéine ou traitées par des drogues et permettent d'appréhender les mécanismes moléculaires à la base de la mécano-transduction (**Vogel and Sheetz, 2006**). Dans ce paragraphe, nous nous attacherons à présenter les principaux substrats utilisés pour l'étude des forces entre cellules et nous présenterons les deux techniques de quantification utilisées au laboratoire.

Afin d'étudier et de mesurer les forces engagées par les cellules, il est particulièrement intéressant d'utiliser des substrats déformables pour dresser une cartographie dynamique des champs de forces exercés par les cellules sur leur environnement. De l'étude des forces qui entrent en jeu a émergé le besoin de développer de nouveaux substrats élastiques se rapprochant du substrat idéal. Un substrat idéal serait économique, souple, simple à réaliser et à caractériser, transparent, linéairement élastique et de rigidité variable (**Kadow et al., 2007**).

Les hydrogels de polyacrylamide sont assez populaires comme substrat de culture cellulaire. Ils ont l'avantage d'être simples à préparer et d'avoir des propriétés optiques compatibles avec les techniques de microscopie. De plus, il est aisé d'en contrôler la rigidité en jouant sur les concentration d'acrylamide et/ou de bis-acrylamide (**Beningo and Wang, 2002**). Les cellules ne présentant pas d'affinité pour les gels de polyacrylamide, plusieurs approches chimiques ont été développées afin de pouvoir recouvrir les substrats de protéines de la matrice extracellulaire et ainsi de favoriser l'adhérence des cellules sur le substrat. Une approche très utilisée est la réticulation chimique, notamment avec le Sulfo-SANPAH, qui permet de greffer de manière covalente des protéines matricielles et ainsi rendre le substrat biocompatible (**Figure 29**) (**Kadow et al., 2007**).

Afin de quantifier les tractions exercées tangentiellement par les cellules sur le substrat, des microbilles sont insérées dans le gel au cours de sa fabrication. Après adhésion et étalement des cellules, les forces engagées entre les cellules et la matrice sont quantifiées en mesurant le déplacement des billes fluorescentes à l'intérieur du gel. Cette mesure indirecte du champ de déplacement des billes permet de remonter au champ de forces développées

tangentiellement par les cellules sur les adhérences focales (**Beningo and Wang, 2002; Wang et al., 2002**).

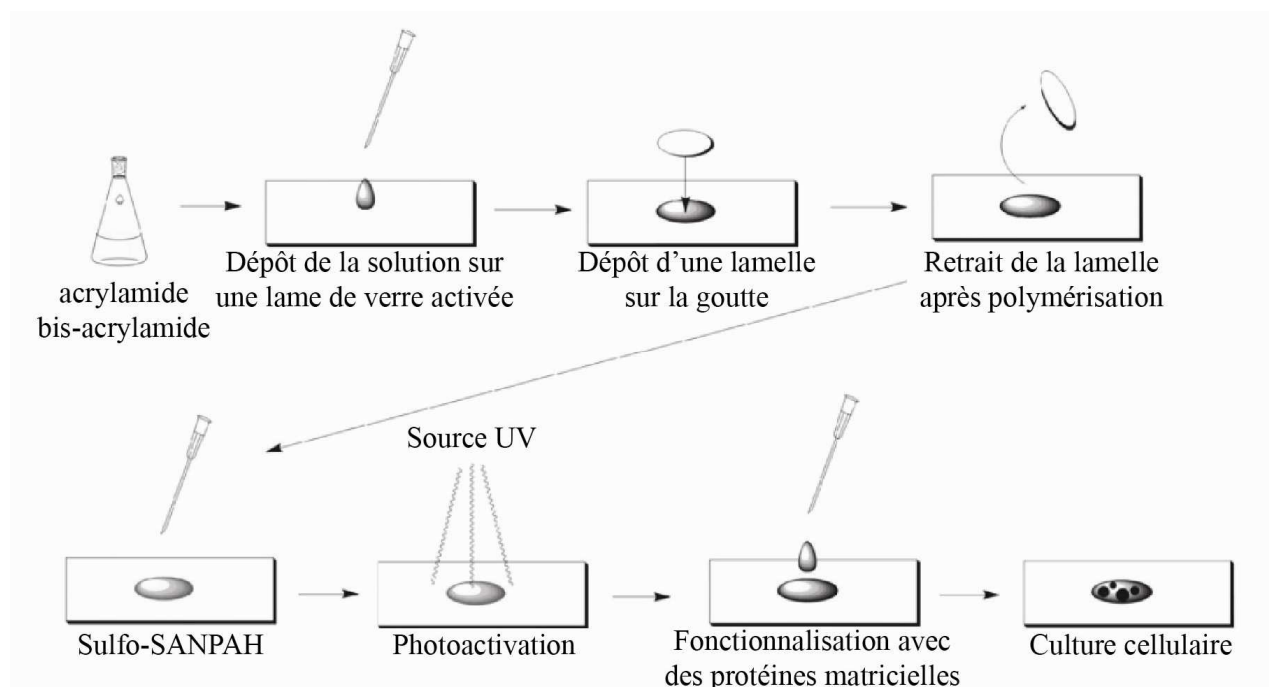


Figure 29 : Fabrication d'hydrogel pour la culture cellulaire

Une solution d'acrylamide/bis-acrylamide est déposée sur une surface activée pour recevoir la solution d'acrylamide. La goutte de solution d'acrylamide est prise entre lame et lamelle pour obtenir une surface plane. Après polymérisation du gel, la lamelle de verre est retirée. L'hydrogel est ensuite traité par du Sulfo-SANPAH, un agent réticulant photo-activable qui permet de fonctionnaliser la surface de l'hydrogel avec des protéines matricielles et permettre l'adhérence des cellules. D'après (**Kandow et al., 2007**).

Le PDMS (PolyDiMethylSiloxane) est un second type de substrat utilisé comme biomatériaux pour la culture cellulaire et l'étude des forces engagées par les cellules. C'est un élastomère très répandu dans le domaine des micro et nanotechnologies. Les caractéristiques du PDMS qui en font un substrat idéal sont : la simplicité et la reproductibilité de sa fabrication, sa transparence compatible avec la microscopie et son élasticité. Néanmoins, le PDMS présente une surface hydrophobe incompatible avec la culture cellulaire. Pour le rendre biocompatible une étape de plasma oxygène est nécessaire afin d'en oxyder la surface pour rendre compatible le greffage de protéines matricielles et ainsi favoriser l'attachement des cellules (**Fuard et al., 2008**). En règle générale, les substrats de PDMS utilisés pour étudier les forces cellulaires sont microstructurés : la surface des substrats n'est pas plane mais recouverte de piliers de PDMS. La culture de cellules sur ce type de substrat permet de visualiser les forces exercées par les cellules en visualisant la déflexion des piliers (**Figure 30**). En mesurant la déflexion des piliers, il est possible de remonter indirectement aux forces

développées par les cellules (**Kajzar et al., 2008**). Ainsi, ce type de méthode a permis d'évaluer les forces de tiraillement exercées par les cellules endothéliales au niveau des jonctions intercellulaires à environ 120 nN. De plus, il a été montré que ces forces régulent la taille des jonctions interendothéliales (**Liu et al., 2010b**).

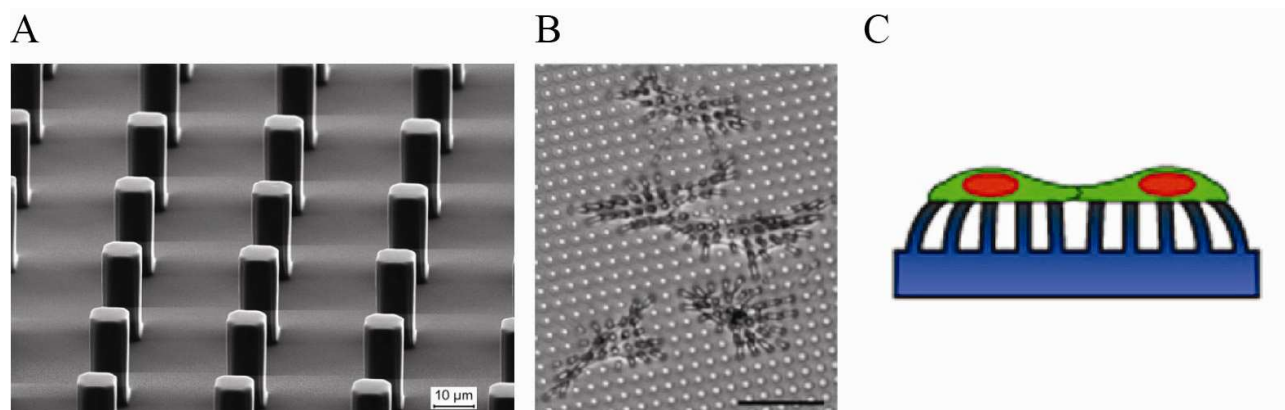


Figure 30 : Utilisation de surface microstructurées pour étudier les forces cellulaires

(A) Image en microscopie électronique d'une surface de PDMS microstructurée de piliers. (D'après (**Kajzar et al., 2008**)) (B) Culture de HPAECs (Human pulmonary artery endothelial cells) sur une surface de PDMS avec des piliers. Barre d'échelle 50 μm. (d'après (**Liu et al., 2010b**)) (C) Représentation schématisée de la déflexion des piliers induite par les forces cellulaires. D'après (**Liu et al., 2010b**).

B. La connexion cytosquelette / jonctions adhérentes

1. Un débat d'actualité

Les manuels de biologie cellulaire présentent les jonctions adhérentes comme des complexes moléculaires à base de cadhérine, responsables de l'adhésion intercellulaire et de l'ancrage du cytosquelette d'actine. En effet, par leur partie extracellulaire, les cadhérines initient des interactions homophiliques tandis que leurs queues cytoplasmiques se lient à la β -caténine et à p120 ; l' α -caténine interagit avec la β -caténine et finalement les filaments d'actine s'accrochent directement à l' α -caténine (**Figure 31**) (**Bazzoni and Dejana, 2004; Gumbiner, 2005; Petzelbauer et al., 2000; Provost and Rimm, 1999**).

Cette vision de l' α -caténine, lien stable entre le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine, a été remise en question il y a quelques années. En 2005, des travaux ont montré que lorsque l' α -caténine lie l'actine, cela diminue très fortement son affinité pour le complexe cadhérine/caténines. De plus, la protéine chimère β -caténine/ α -caténine est

incapable de précipiter des filaments d'actine. En résumé, l' α -caténine ne serait pas le pont qui assurerait l'ancrage du cytosquelette d'actine aux jonctions adhérentes (**Yamada et al., 2005a**). Quel serait alors le rôle de l' α -caténine ? Les travaux de l'équipe de Nelson proposent une vision plus dynamique de la participation de l' α -caténine au complexe jonctionnel et à la régulation du cytosquelette d'actine. Dans la cellule, l' α -caténine existe sous forme de monomères, d'homodimères et d'hétérodimères (en association avec la β -caténine). Les monomères d' α -caténine se lient à la β -caténine. Une fois relargués du complexe jonctionnel, les monomères d' α -caténine se dimérisent et inhibent l'activité du complexe Arp2/3, favorisant ainsi la réorganisation du cytosquelette d'actine d'un réseau branché à un réseau d'actine sous forme de câbles (**Drees et al., 2005; Hartsock and Nelson, 2008**).

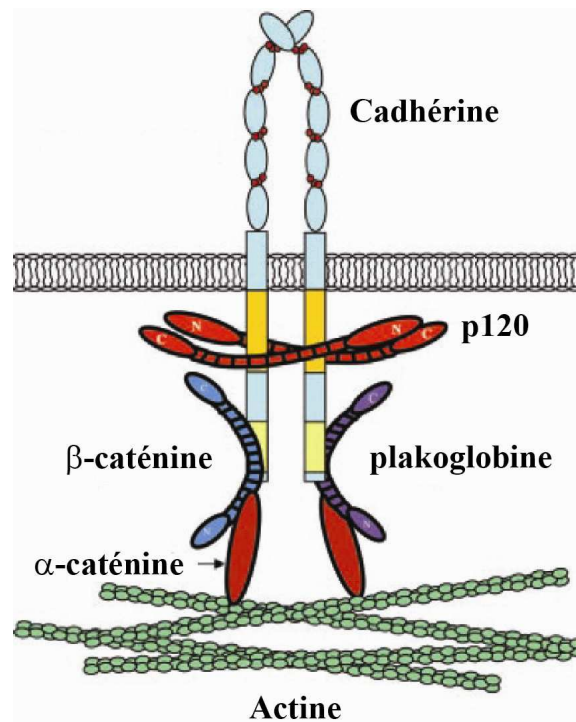


Figure 31 : Modèle décrivant la connexion entre cadhérines et cytosquelette d'actine

Les cadhérines sont à l'origine de l'adhérence homophile. Par leur extrémité cytoplasmique, les cadhérines se lient à des partenaires intracellulaires, notamment la β -caténine, qui en retour, se lie à l' α -caténine. Les filaments d'actine interagissent avec l' α -caténine. Dans ce modèle datant de 2004, les cadhérines sont directement reliées au cytosquelette d'actine par les caténines. D'après (**Vincent et al., 2004**).

Depuis cette remise en question, les travaux se multiplient pour déterminer la nature exacte du lien entre jonction adhérente et cytosquelette. Il est certain que l'ancrage du cytosquelette aux jonctions adhérentes est un élément crucial nécessaire aux nombreux

remodelages que subit une jonction adhérente au cours de sa vie (**Cavey and Lecuit, 2009; Gumbiner, 2005**).

2. Cytosquelette/VE-cadhérine : une relation de haute importance

Le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans l'adhérence intercellulaire. Pour s'en rendre compte, il suffit d'observer les effets engendrés par des drogues affectant la capacité du cytosquelette à polymériser comme la cytochalasine D ou la latrunculine B (deux agents induisant la dépolymérisation du cytosquelette d'actine). Sous l'action de ces drogues, l'endothélium est très fortement perturbé. La dépolymérisation du cytosquelette d'actine engendre la déstabilisation des jonctions adhérentes (données du laboratoire et (**Waschke et al., 2005**)).

Les sites d'adhésion à base de cadhérines sont des sites où la surface cellulaire est couplée mécaniquement au cytosquelette d'actine (**Mege et al., 2006**). Le bénéfice pour les cadhérines et l'actine est réciproque : alors que les sites d'adhésion riche en cadhérines influencent l'organisation du cytosquelette d'actine notamment via l' α -caténine (**Drees et al., 2005; Hartsock and Nelson, 2008**), l'intégrité du cytosquelette d'actine est nécessaire à l'établissement de jonctions adhérentes à base de cadhérines (**Kovacs and Yap, 2008**). Cette interdépendance entre cadhérines et cytosquelette d'actine joue également un rôle important dans l'organisation tissulaire et la morphogénèse (**Gumbiner, 2005; Niessen et al., 2011**). L'ancrage du cytosquelette au complexe cadhérine/caténine n'est pas essentiel à la formation de liaisons adhésives entre cellules. Néanmoins, le cytosquelette doit être ancré aux jonctions pour transmettre les forces nécessaires aux changements de forme de la cellule (arrondissement au cours de la mitose par exemple), aux mouvements cellulaires et à l'établissement de la polarité cellulaire (**Gumbiner, 2005**).

Plus particulièrement, il existe une très forte coopération entre VE-cadhérine et cytosquelette d'actine dans de nombreux processus cellulaires :

- la formation des jonctions interendothéliales (**Waschke et al., 2005**) et notamment le transport des clusters de VE-cadhérine à l'extrémité des filopodes pour l'établissement des premiers contacts intercellulaires (**Almagro et al., 2010**)
- la mécano-transduction des forces de traction exercées aux contacts intercellulaires de l'endothélium (**Liu et al., 2010b**) et notamment la réponse cellulaire au « shear stress » (**Tzima, 2006; Tzima et al., 2005**)
- la régulation de la perméabilité endothéliale et en particulier au cours de la transmigration leucocytaire (**Liu et al., 2010a**)

- la régulation de la prolifération cellulaire : l'altération des fibres de stress, la suppression des tensions générées par l'actomyosine ou l'inhibition de Rho conduisent à l'inhibition du signal prolifératif initié par la VE-cadhérine (**Nelson and Chen, 2003**).

3. Quelques acteurs de cette connexion

a. L'annexine A2

L'annexine A2 appartient à la superfamille des annexines qui sont des protéines caractérisées par leur capacité à se lier aux phospholipides membranaires de manière calcium dépendante. L'annexine A2 est impliquée dans les interactions membrane-membrane et membrane-cytosquelette. Plus spécifiquement, par ses propriétés à fusionner les membranes, elle participe à la régulation de certaines étapes du transport intracellulaire comme l'exocytose et l'endocytose (**Gerke et al., 2005**).

Les travaux réalisés au sein du laboratoire ont montré que l'annexine A2 est un partenaire abondant du complexe à base de VE-cadhérine (analyse protéomique) et qu'elle interagit directement avec le complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine (détection par co-immunoprécipitation). Cette interaction avec la VE-cadhérine a été confirmée par une autre équipe en 2010 : le sphingosine 1-phosphate déclencherait le transport de l'annexine A2 du compartiment cytosolique à la membrane où elle s'associe à la VE-cadhérine (**Su et al., 2010**). La connexion entre les annexines, plus particulièrement l'annexine A2, et le cytosquelette d'actine est un fait établi et c'est aussi ce qui lui vaut d'appartenir à la famille des « Actin Binding Protein » (**Hayes et al., 2004; Hayes et al., 2006**). Des études de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) sur des cellules co-exprimant de l'annexine A2-CFP et de l'actine-YFP ont montré un transfert d'énergie entre les deux molécules dans le cytoplasme et les protrusions membranaires, suggérant une interaction directe entre les deux molécules (**Hayes et al., 2006**).

En s'associant avec la VE-cadhérine des jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actine corticale, l'annexine A2 maintient la VE-cadhérine au niveau des jonctions intercellulaires. En effet, il semblerait que l'annexine A2, présente au niveau des radeaux de cholestérol, arrime à la fois le complexe à base de VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine, renforçant ainsi les jonctions adhérentes mûres d'un tapis cellulaire confluent (**Figure 32**) (**Heyraud et al., 2008**).

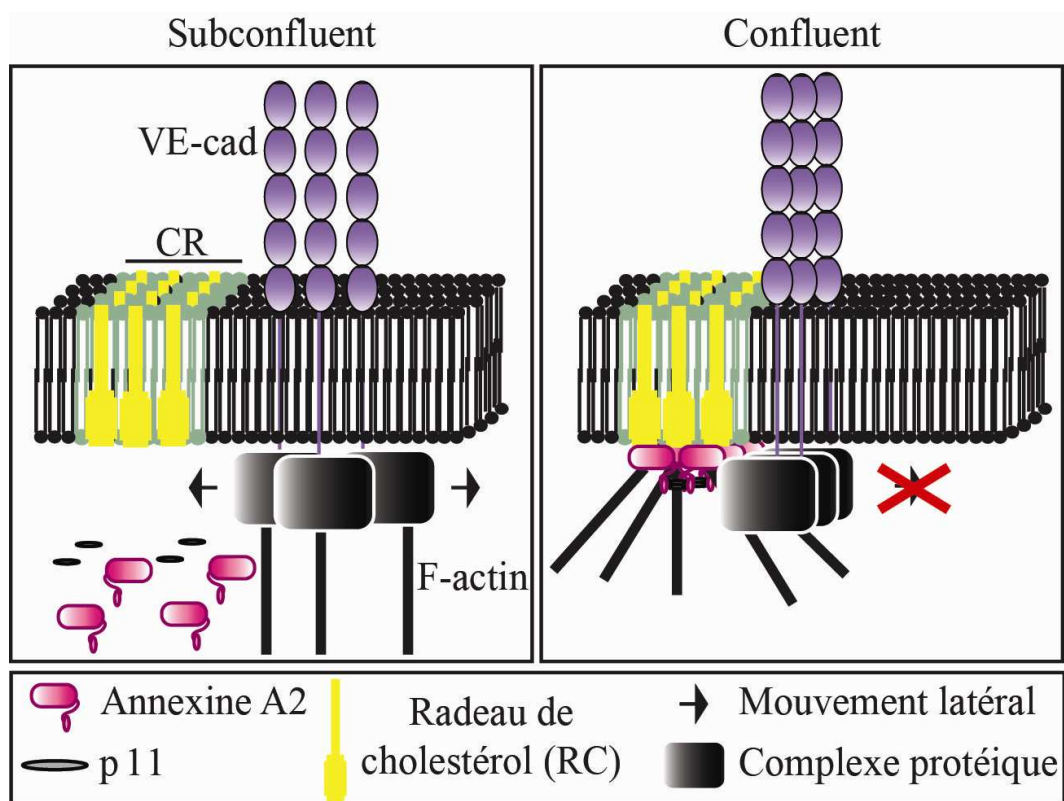


Figure 32 : Mécanisme potentiel de stabilisation de la VE-cadhérine par l'annexine A2

Les jonctions adhérentes sont immatures et peu associées au cytosquelette d'actine lorsque les cellules HUVECs ne sont pas confluentes. Le complexe à base de VE-cadhérine est alors libre de bouger latéralement dans la membrane. En revanche, quand les cellules atteignent la confluence et que les jonctions adhérentes sont matures, le complexe annexine A2/p11, accumulé sous la membrane au niveau des radeaux de cholestérol, s'associe au complexe à base de VE-cadhérine. De cette manière, l'annexine A2 procure un lien entre le complexe VE-cadhérine/caténines et le cytosquelette d'actine et stabilise les jonctions adhérentes. D'après (Heyraud et al., 2008).

b. La myosine X

La myosine X, comme son nom l'indique, appartient à la famille des myosines. Avec les dynéines et les kinésines, les myosines sont des protéines motrices. Alors que les dynéines et les kinésines se déplacent sur les microtubules, les myosines se meuvent le long des filaments d'actine. En effet, ces protéines possèdent un domaine moteur très conservé localisé sur l'extrémité Terminale qui leur permet d'hydrolyser l'ATP pour générer des forces. La myosine X est une myosine non conventionnelle qui possède une dizaine de domaines d'interactions potentielles avec des protéines ou avec les membranes (Berg et al., 2000) (Figure 33 A).

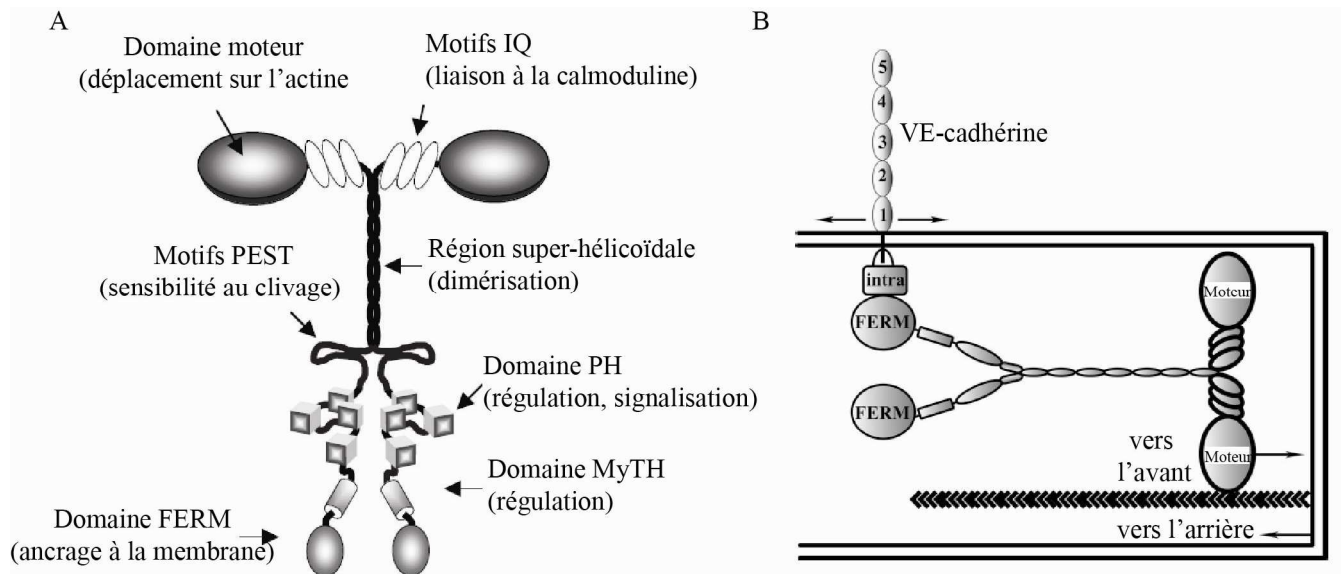


Figure 33 : Myosine X, structure et fonction

(A) Modèle de dimérisation de deux molécules de myosine X par interaction des domaines superhélicoïdaux. Ce modèle propose également des domaines fonctionnels : domaine moteur (déplacement sur les filaments d'actine), motifs IQ (impliqués dans la liaison à la calmoduline), domaines PH (Plekstrin Homology), implication dans la signalisation par le phosphoinositide et/ou les interactions protéine/protéine), domaine MyTH4 (Myosin Tail Homology 4, potentiellement domaine régulateur ou domaine cible présent dans d'autres moteurs moléculaires comme les kinésines), domaine FERM (band 4.1/Ezrin/Moesin/Radixin, impliqué dans l'ancrage à la membrane), motifs PEST (motifs riches en proline, glutamate, sérine et thréonine, cibles probables pour le clivage protéolytique). D'après (**Berg et al., 2000**). (B) Représentation schématique des mouvements de clusters de VE-cadhérine transportés par la myosine X dans les filopodes. La myosine X se lie à l'actine par son domaine moteur et au complexe VE-cadhérine/caténines *via* son domaine FERM. Par conséquent, les clusters de VE-cadhérines se déplacent vers la pointe (700 nm.s⁻¹) ou vers l'arrière des filopodes (30 nm.s⁻¹). D'après (**Almagro et al., 2010**).

La myosine X utilise sa fonction motrice pour se déplacer sur les filaments d'actine intrafilopodiaux (**Berg and Cheney, 2002**). Elle possède une fonction cargo qui lui permet de transporter les intégrines, en se liant à leur sous-unité β , ainsi que le complexe nucléateur de l'actine Mena/VASP (**Tokuo and Ikebe, 2004; Zhang et al., 2004**). De plus, il a été montré que la myosine X favorise la formation des filopodes : alors que sa surexpression stimule la croissance des filopodes la diminution de son expression entrave en revanche leur formation (**Bohil et al., 2006**).

Des travaux réalisés au laboratoire ont confirmé l'implication de la myosine X dans la formation des filopodes. Les filopodes sont des régions riches en myosine X et en actine (**Berg et al., 2000**) qui initient les mécanismes de réparation de l'endothélium en permettant la re-formation des jonctions adhérentes. En s'associant à la myosine X, la VE-cadhérine est transportée le long des filopodes. En effet, il a été établi par voie biochimique et observation

en vidéomicroscopie que la myosine X gouverne les mouvements des « clusters » de VE-cadhérine le long des filopodes (**Figure 33 B**) (**Annexe**) (**Almagro et al., 2010**). D'autre part, il a également été montré que la myosine X s'attache sélectivement aux câbles d'actine réticulés par la fascine. Le module responsable de cette sélectivité est la queue de la myosine X. En effet, en introduisant une flexibilité supplémentaire à la queue de la myosine X, celle-ci devient incapable d'identifier les câbles d'actine réticulés par la fascine (**Nagy and Rock, 2010**). Les résultats mettent en évidence un nouveau domaine de la queue de la myosine X qui positionnent les têtes de myosine X de manière adéquate pour reconnaître les câbles d'actine qui dirigent les flux de myosine X et de ses partenaires, comme la VE-cadhérine, à la pointe des filopodes (**Nagy et al., 2008; Nagy and Rock, 2010**).

c. Les autres partenaires

Comme nous l'avons présenté précédemment, la connexion entre complexe cadhérine/caténine et cytosquelette d'actine n'est pas une connexion stable et figée contrôlée par l' α -caténine (**Drees et al., 2005**). D'ailleurs, il est à présent établi que l' α -caténine n'est pas essentielle à la stabilité de la E-cadhérine. En effet, il a été montré, que suite à l'extinction de l' α -caténine dans des embryons de drosophile, subsiste un « pool » d'actine qui se localise aux jonctions adhérentes et les stabilise indépendamment de l' α -caténine (**Cavey et al., 2008**). La question se pose alors de savoir quelle(s) protéine(s) est(sont) responsable(s) de l'ancrage du cytosquelette d'actine au niveau des jonctions adhérentes ?

A ce sujet, la littérature propose de nombreux médiateurs qui agiraient en ce sens. En effet, beaucoup d'« Actin Binding Protein », comme la vinculine (**Watabe-Uchida et al., 1998a**), l' α -actinine (**Knudsen et al., 1995; Nieset et al., 1997**), la formine (**Zigmond, 2004**), ZO-1 (**Imamura et al., 1999a**) et Ajuba (**Marie et al., 2003**), sont capables d'interagir avec l' α -caténine et fournissent un lien potentiel entre complexe adhérent et cytosquelette d'actine. D'ailleurs, il a été montré que la vinculine et Ajuba, en s'associant directement avec l' α -caténine, participent à l'ancrage du complexe E-cadhérine/caténines au cytosquelette d'actine corticale dans les cellules épithéliales (**Marie et al., 2003; Watabe-Uchida et al., 1998a**). Une autre possibilité à évoquer pour expliquer le lien entre cytosquelette et jonction adhérente est l'existence de protéines qui établissent des connexions indépendamment de l' α -caténine. On peut ici de nouveau mentionner la vinculine. En effet, celle-ci est également capable d'interagir avec la β -caténine et de stabiliser la E-cadhérine à la surface cellulaire (**Hazan et al., 1997; Peng et al., 2009**). Des expériences d'imagerie ont également révélé qu'une accumulation de vinculine coïncide avec les sites d'adhésion intercellulaires riches en actine.

Ces travaux suggèrent également que la vinculine puisse faire le lien entre complexe adhésif et cytosquelette d'actine au cours du processus de mécano-transduction initié par les forces intracellulaires (**le Duc et al., 2010**).

On peut ici conclure à l'existence de multiples connexions entre complexe adhérent et cytosquelette d'actine, que ce soit via ou indépendamment de l' α -caténine. La jonction adhérente est une structure dynamique dont la composition varie en fonction des stimuli environnementaux, de son degré de maturité et de sa stabilité. C'est sans aucun doute cette multiplicité des acteurs de la connexion entre jonction adhérente et cytosquelette d'actine qui explique le caractère dynamique des jonctions intercellulaires. La plupart des études ont porté sur la E-cadhérine et il serait bon de s'intéresser aux liens entre les autres cadhérines et le cytosquelette d'actine.

RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

I. EPLIN à l'interface entre complexe adhérent et cytosquelette d'actine

A. Contexte de l'étude

Au cours de ces dernières années le mécanisme d'ancrage des jonctions adhérentes au cytosquelette d'actine a été très étudié. Comme évoqué dans le paragraphe III.B 1. Un débat d'actualité, plusieurs études ont démontré que l' α -caténine ne pouvait à elle seule ancrer le complexe jonctionnel au cytosquelette d'actine. Au laboratoire, les travaux de S.Heyraud sur l'analyse protéomique des différents partenaires co-immunoprécipités avec la VE-cadhérine ont mis en évidence de nombreuses protéines de liaison à l'actine. Ces résultats laissaient déjà entrevoir la multiplicité des liens pouvant exister entre le complexe à base de VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine. Parmi toutes les « Actin Binding Protein » identifiées se trouvaient notamment les annexines, les myosines et les ERM (Ezrin/Radixin/Moesin). Les données acquises aux laboratoires par S.Heyraud et S.Almagro ont permis de mettre en évidence deux types de connexions entre le cytosquelette d'actine et le complexe à base de VE-cadhérine : la myosine X intervient aux temps précoces de l'élaboration des jonctions en transportant la VE-cadhérine le long des filopodes (cf. III.B.3.b. La myosine X et Annexe) alors que l'annexine A2 intervient lorsque les jonctions adhérentes sont matures pour arrimer le complexe jonctionnel aux radeaux de cholestérol (cf. III.B.3.a. L'annexine A2) (**Almagro et al., 2010; Heyraud et al., 2008**). Concernant EPLIN, bien que non identifiée au cours de l'analyse protéomique des partenaires de la VE-cadhérine menée au laboratoire, elle fut identifiée au cours de l'analyse protéomique des partenaires de l' α -caténine par l'équipe de Takeichi. Ce dernier a également montré qu'EPLIN établit un lien entre le complexe E-cadhérine/ β -caténine et le cytosquelette d'actine (**Abe and Takeichi, 2008**). Cette étude ayant piqué notre curiosité, nous nous sommes intéressés de plus près à cette nouvelle protéine.

1. Bref historique de la protéine

A ce jour, seulement 21 publications ont trait à l'EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm). L'histoire d'EPLIN commence en 1998 lorsque Chang et ses collaborateurs réalisent une analyse des gènes différentiellement exprimés dans une lignée épithéliale normale versus cette même lignée immortalisée par le papilloma virus humain (**Chang et al., 1998**). Par la suite, l'équipe de Chang s'est focalisée sur un gène en particulier, préférentiellement exprimé dans la lignée normale codant EPLIN. Cette protéine possède un

domaine LIM d'interaction protéine-protéine qui lui permet de se dimériser ou d'interagir avec d'autres partenaires protéiques (**Maul et al., 2003**). L'analyse du gène a conduit à l'existence d'une seule copie du gène codant deux isoformes, appelées α et β , suggérant l'existence d'un épissage alternatif. Sur les 21 lignées de cellules cancéreuses testées, 20 d'entre elles expriment très faiblement l'isoforme α d'EPLIN. C'est pourquoi le produit de ce gène porte le nom d'EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm) : protéine épithéliale perdue dans les néoplasmes (**Maul and Chang, 1999**).

L'équipe de Chang a démontré l'existence de deux promoteurs distincts pour les deux isoformes qui peuvent être régulées l'une indépendamment de l'autre (**Chen et al., 2000**). Une étude récente a même montré que la transcription d'EPLIN α est régulée par la voie de signalisation actine/MAL/SRF. L'actine G monomérique contrôle l'activité du facteur de transcription SRF (Serum Response Factor) en formant un complexe répressif avec ses co-activateurs MAL/MRTF. Après induction du signal, le co-activateur MAL/MRTF est relargué du complexe répressif, se lie au facteur de transcription SRF et active l'expression des gènes cibles. A l'inverse, l'isoforme β d'EPLIN demeure non affecté par la voie de signalisation actine/MAL/SRF (**Leitner et al., 2010**).

Enfin, la comparaison des séquences du gène EPLIN chez l'humain, la souris et le poisson zèbre a mis en évidence les zones de divergence et les domaines fortement conservés facilitant ainsi les études structure-fonction de cette protéine (**Maul et al., 2001**).

Les premières investigations sur la fonction d'EPLIN dans les cellules ont porté sur la distribution subcellulaire de l'EPLIN endogène. La localisation des deux isoformes reflète l'organisation des fibres d'actine. De plus, bien que cela n'ait jamais été fermement établi, plusieurs auteurs mentionnent la présence d'EPLIN au niveau des plaques d'adhérence focale (données publiées mais non fermement démontrées (**Maul and Chang, 1999; Maul et al., 2003**)). Une autre équipe décrit une intensification du marquage paxilline après surexpression d'EPLIN suggérant un rôle potentiel d'EPLIN dans les plaques d'adhérence focales (**Sanders et al., 2010**). Des études biochimiques ont révélé trois propriétés importantes de cette protéine vis-à-vis de l'actine. Premièrement, la molécule d'EPLIN comprend deux sites d'interaction pour l'actine situés de part et d'autre du domaine LIM, ce qui lui vaut d'être cataloguée comme une « actin binding protein ». Elle est de plus capable de réticuler et d'assembler les filaments d'actine. Deuxièmement, EPLIN stabilise les filaments d'actine *in vitro*. Enfin, EPLIN inhibe la nucléation de l'actine via le complexe Arp2/3 (**Maul et al., 2003**). Ces différentes propriétés liées à l'actine ont valu à EPLIN d'être étudiée dans différents processus mettant en jeu un remaniement du cytosquelette d'actine comme au cours de la

cytokinèse, la migration et la motilité cellulaire et les jonctions intercellulaires (**Abe and Takeichi, 2008; Chircop et al., 2009; Han et al., 2007; Jiang et al., 2008**). Les tout derniers travaux publiés sur EPLIN font état du rôle joué par le « pool » d'EPLIN liée à l' α -caténine dans le processus de remodelage des jonctions épithéliales. En effet, les cellules épithéliales remodelent l'architecture de leurs jonctions en réponse à des forces mécaniques. Il a été montré que le recrutement d'EPLIN aux jonctions adhérentes épithéliales serait conditionné par l'état des tensions environnantes (**Taguchi et al., 2011**).

2. Structure d'EPLIN

EPLIN existe sous deux isoformes α et β de poids moléculaires théoriques de 67 et 85kDa respectivement (**Figure 34**). L'isoforme β d'EPLIN (760 acides aminés) possède une extension N-Terminale de 160 acides aminés mais reste identique à l'isoforme α (600 acides aminés) pour le reste (**Maul and Chang, 1999**). Le seul domaine repérable dans la séquence en acides aminés est un domaine central LIM de 54 résidus, dont le rôle serait de permettre à EPLIN de se dimériser ou de s'associer avec d'autres protéines (**Maul et al., 2003**).

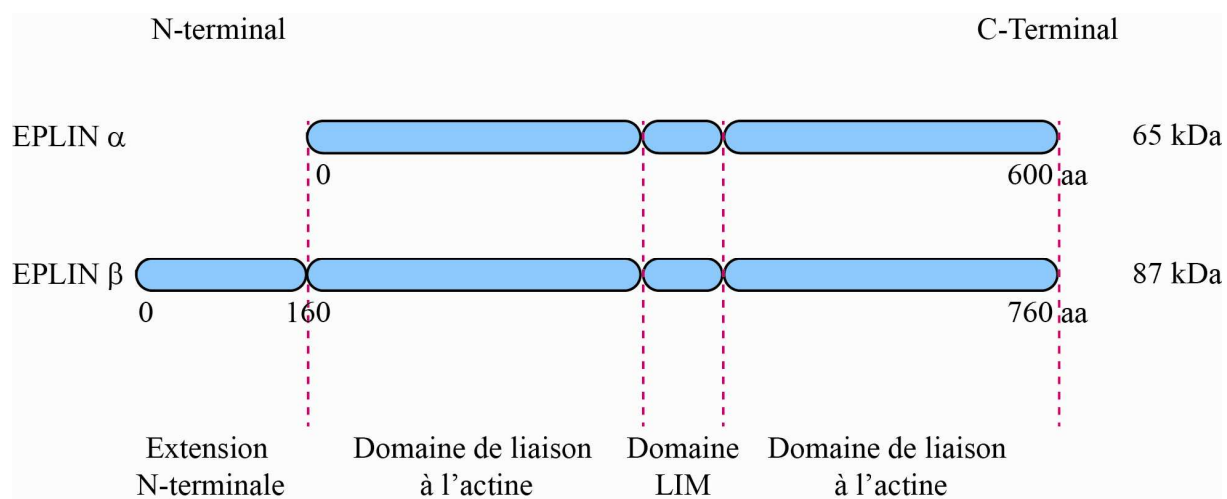


Figure 34 : Représentation schématique de la structure d'EPLIN

Représentation des deux isoformes α et β d'EPLIN et de leur domaines fonctionnels : un domaine LIM de 54 résidus d'interaction protéine/protéine, deux domaines connus pour se lier à l'actine et une extension N-Terminale de 160 acides aminés pour l'isoforme β . D'après (**Maul and Chang, 1999; Maul et al., 2003**).

Des tests d'interaction sur protéines purifiées ont démontré l'existence d'au moins deux domaines de liaison à l'actine situés de part et d'autre du domaine LIM. En effet, les constructions tronquées d'EPLIN contenant seulement le domaine N- ou C-Terminal fusionné à la GST sont capables de lier l'actine monomérique, cependant de manière moins efficace que la protéine EPLIN α entière. Le domaine LIM seul, quant à lui, est incapable de lier l'actine (**Maul et al., 2003**).

Par ailleurs, les deux isoformes α et β d'EPLIN interagissent avec l' α -caténine. La délétion du domaine LIM n'empêche pas l'interaction EPLIN/ α -caténine. En revanche, l'ablation de l'extrémité N- ou C-Terminale l'abolit, suggérant que ces deux régions sont nécessaires à l'interaction EPLIN/ α -caténine (**Abe and Takeichi, 2008**).

3. Implication d'EPLIN dans la dynamique des contacts intercellulaires et l'angiogenèse

Comme mentionné précédemment, le lien entre cadhérine et cytosquelette d'actine fait encore débat. Cette question est pourtant au cœur des thématiques de notre équipe. Dans une publication récente, l'équipe de Takeichi s'est intéressé au mécanisme qui permet au complexe cadhérine-caténine de coopérer avec l'actine afin d'élaborer les structures jonctionnelles adhérentes. EPLIN a été identifiée comme ce lien manquant. Cette équipe a ainsi démontré qu'EPLIN se lie à l' α -caténine, associant le complexe β -caténine/E-cadhérine au cytosquelette d'actine ce qui aboutit à la stabilisation des fibres d'actine qui forment la ceinture d'adhérence. Ceci montre bien que l' α -caténine soutient la fonction adhésive de la E-cadhérine en ancrant les clusters de E-cadhérine au cytosquelette d'actine (**Abe and Takeichi, 2008**). Dans sa revue, Vestweber souligne qu'il serait important de s'intéresser d'une part à la fonction d'EPLIN au sein des cellules endothéliales et de rechercher d'autre part de nouvelles protéines capables de relier le complexe jonctionnel au cytosquelette d'actine (**Vestweber et al., 2009**). C'est pourquoi, nous avons spécifiquement porté notre attention sur EPLIN afin de déterminer son rôle au sein de l'endothélium vasculaire.

B. Principaux résultats: article

EPLIN INTERACTS WITH α -CATENIN AND ACTIN FILAMENTS IN ENDOTHELIAL CELLS AND *IN VITRO* STABILIZES THE VASCULAR CAPILLARY NETWORK

Adeline Chervin-Pétinot^{1,2,3}, **Marie Courçon**^{1,2,3}, **Sébastien Almagro**^{1,2,3,7}, **Alice Nicolas**^{4,5}, **Alexei Grichine**^{3,6}, **Didier Grunwald**, **Marie-Hélène Prandini**^{1,2,3}, **Philippe Huber**^{1,2,3}, **Danielle Gulino-Debrac**^{1,2,3,8}

From Structure mixte INSERM, CEA, Université : ¹ INSERM U882, F-38054 Grenoble, France ; ² CEA, DSV, iRTSV, F-38054 Grenoble, France ; ³ Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France

From Structure mixte CNRS, CEA: ⁴ Laboratoire des Technologies de la Microélectronique, CNRS UMR5129, F-38054 Grenoble, France ; ⁵ CEA-LETI-D2NT, F-38054 Grenoble, France

From Structure mixte INSERM, Université: ⁶ INSERM U823, F- 38706 La Tronche, France

³ Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38041, France ;

§ to whom correspondence should be addressed : Fax: 33 - (0)4 38 78 49 64,

Address : Danielle Gulino-Debrac, INSERM U1036, iRTSV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, F-38054, Grenoble Cedex 9, France

E-mail: danielle.gulino@cea.fr

⁷ Present address : CNRS UMR 6237, Université de Champagne Ardenne, F-51687 Reims, France

Running title: Stabilization of *in vitro* vascular capillary network by EPLIN

Adherens junctions are required for vascular endothelium integrity. These structures are formed by the clustering of the homophilic adhesive protein VE-cadherin, which recruits intracellular partners, such as β and α -catenins, vinculin and actin filaments. The prevailing dogma according to which α -catenin bridges cadherin- β -catenin complexes to the actin cytoskeleton has been challenged during the past few years and the link between the VE-cadherin-catenin complex and the actin cytoskeleton remains unclear. Recently, EPLIN (Epithelial Protein Lost In Neoplasm) has been proposed as a possible bond between the E-cadherin-catenin complex and actin in epithelial cells. Herein, we show that EPLIN is expressed at similar levels in endothelial and epithelial cells and is located at interendothelial junctions in confluent cells. Co-immunoprecipitation and GST-

pull-down experiments provided evidence that EPLIN interacts directly with α -catenin and tethers VE-cadherin-catenin complex to the actin cytoskeleton. In absence of EPLIN, vinculin was delocalized from the junctions. Furthermore, suppression of actomyosin tension using blebbistatin triggered a similar vinculin delocalization from the junctions. In Matrigel assay, EPLIN-depleted endothelial cells exhibited a reduced capacity to form pseudo-capillary networks because of numerous breakage events. In conclusion, we propose a model in which the EPLIN link between the cadherin-catenin complex and actin is independent of actomyosin tension, but acts as a mechanotransmitter allowing vinculin binding to α -catenin and formation of a secondary molecular link between the adherens complex and the cytoskeleton through vinculin. In addition, we provide evidence that the EPLIN clutch is necessary

for stabilization of capillary structures

The endothelium forms a semi-permeable barrier regulating the passage of macromolecules and circulating cells between blood and tissues. Historically viewed as a passive vascular lining, vascular endothelium is instead a dynamic tissue submitted to a continuous remodelling required for physiological and pathological processes such as wound healing and angiogenesis (1-2). Barrier function of the endothelium is in large part regulated by adherens junctions. These adherens junctions comprise the transmembrane adhesive receptor VE-cadherin (VE-cad) that is the main protein involved in homophilic/ homotypic cell-to-cell adhesion (3)-(4).

VE-cad recruits intracellular partners that establish specific links with the actin cytoskeleton and, consequently, stabilize the interendothelial junctions (5). As its epithelial homolog E-cadherin, VE-cad directly interacts with intracellular β and γ -catenins which in turn bind α -catenin. Until recently, it was widely accepted that α -catenin strengthens cadherin-mediated adhesion by promoting anchorage to actin cytoskeleton. A few years ago, this concept was challenged by studies demonstrating that α -catenin is unable to bind simultaneously β -catenin and actin (6)-(7). However it is still accepted that the lack of catenin association to F-actin destabilizes cadherin-mediated cell adhesion.

The question of the links between the cadherin complex and actin cytoskeleton is more complex than previously envisioned since α -catenin is a multimodular molecule that undergoes, under the action of mechanical strengths, conformational changes unmasking cryptic ligand binding sites. Thus, while the N-terminal domain of α -catenin remains accessible for interacting with β/γ -catenins, its central domain recruits vinculin and probably α -actinin (8) through force-dependent changes of its conformation (9). These data support the

in an angiogenesis model.

notion that α -catenin is a tension transducer (9) and led to the concept that intermediate proteins bridge α -catenin to actin cytoskeleton (10).

Interestingly, a recent study identified a novel protein that is able to bind both α -catenin and actin filaments. This protein called EPLIN (Epithelial protein lost in Neoplasm) also known as Lima-1 was first identified as the product of a gene differentially expressed in normal and cancer cells (11). Two isoforms of EPLIN, designated as EPLIN α and EPLIN β are generated from this gene by two distinct promoters (12). The sequences of these two isoforms differ by the addition of a 160 amino acid extension at the N-terminus of the α isoform.

EPLIN belongs to the family of LIM domain proteins as it contains a centrally located LIM domain known to form two closely packed zinc-binding subdomains (13). Additionally, EPLIN exhibits two functional acting binding sites, one on each side of the centrally located LIM domain, that give it the ability to cross-link and bundle actin filaments (14). *In vitro*, EPLIN stabilizes actin filaments by preventing their depolymerisation and blocks the formation of branched filaments by inhibiting actin nucleation by Arp2/3 (14). Based on these properties, EPLIN appears implicated in different actin-related processes such as cell motility and migration, cytokinesis and intercellular junctions (15-16), (17), (18). Subsequent *in vivo* studies confirmed the down-regulation of EPLIN α in a number of human epithelial cancer cells and tissues suggesting that the loss of EPLIN α could contribute to the transformed phenotype. This indicates that EPLIN may act as a tumour suppressor (15).

In the endothelium, the presence of EPLIN is questionable since EPLIN α transcript was previously shown to be undetectable in Human Umbilical Vascular Endothelial cells (HUVEC) by

RT-PCR (15) while EPLIN α protein was faintly detected in primary aortic endothelial cells (12). In the present manuscript, we provide evidence that EPLIN is expressed at the mRNA and protein levels in HUVECs. In confluent endothelial cell monolayers, EPLIN appeared distributed along the actin cortical ring where it colocalized with α -catenin. Since EPLIN was found in epithelial cells to bridge E-cadherin-catenin complex to F-actin via α -catenin, we tested whether EPLIN has the same interactants in endothelial cells as in epithelial cells. By immunoprecipitation and GST-pull-down experiments, we showed that EPLIN directly interacted with α -catenin anchored to the VE-cad- β -catenin complex thus providing a possible link with the actin cytoskeleton. We have also explored the impact of EPLIN depletion on endothelial cell behaviour. We observed that EPLIN down-regulation by siRNA did not modify HUVEC proliferation, adhesion and migration. Nevertheless, our immunofluorescence analyses showed that the cortical actin ring

is dramatically disturbed in EPLIN-silenced HUVECs. Similarly, we noted that EPLIN is necessary for the recruitment of vinculin at endothelial cell-cell junctions. Vinculin and EPLIN are both direct α -catenin partners. We showed that vinculin accumulation at cell-cell junctions requires myosin-II activity whereas EPLIN is recruited independently of myosin-II contractility. From these observations, we proposed that EPLIN operates as a tension transmitter at endothelial cell-cell junctions. In addition, the behaviour of HUVECs is strongly affected by the abrogation of EPLIN expression in *in vitro* angiogenesis. On Matrigel matrix, EPLIN depletion promoted the rapid regression of the vascular capillary network that exhibited excessive fragility. Our data support the notion that EPLIN, by connecting the VE-cad-catenin complex to the actin cortical ring and by promoting vinculin junctional recruitment, reinforces the cohesion of cell-cell junctions that become more resistant to the strengths generated by the vascular network.

Experimental Procedures

Reagents and antibodies—Blebbistatin (Calbiochem) was prepared as a 50 mM stock in dimethylsulphoxide (DMSO) and used at 5 to 50 μ M. The monoclonal anti-EPLIN (BD Biosciences and Santa Cruz Laboratories), anti- β -tubulin (Sigma), anti-actin (Sigma), anti-VE-cad (BV9) (19) (20), anti-vinculin (7F9, Santa Cruz Laboratories) and anti- β -catenin (BD Biosciences) antibodies and the polyclonal rabbit anti- α -catenin (Sigma), goat anti-VE-cadherin (C19, Santa Cruz Laboratories) and rabbit anti-EPLIN (Bethyl Laboratories) antibodies were used in Western blot, immunoprecipitation and immunofluorescence experiments. The secondary Cy3-conjugated anti-mouse antibody and the secondary HRP-conjugated antibodies were from Jackson Immunoresearch Laboratories while the secondary Alexa 488-conjugated anti-

rabbit and anti-goat, Alexa 568-conjugated anti-mouse antibodies and the Alexa 633- and Alexa 647- conjugated Phalloidin were from Invitrogen. siRNAs specific for human EPLIN (18) and control siRNA were obtained from Invitrogen.

cDNA constructs and protein expression in *E. coli*—A cDNA fragment encoding the full length sequence of human EPLIN α was produced by polymerase chain reaction (PCR) using the clone IRATp970H10110D (ImaGenes) as a template and the following pair of oligonucleotide primers: forward: 5'-GCAGGATCCATGGAAAATTGTCT-3' and reverse: 5'-TGCGGTACCTCACTCTTCATCCT-3'. After digestion with BamHI and KpnI, the PCR fragment was inserted into the plasmid pQE30 (Qiagen) to elaborate the vector pQE30-EPLIN α coding for human

EPLIN α fused with an N-terminus His (His-EPLIN)(68.5 kDa). Similarly, a cDNA fragment encoding the full length sequence of human α -catenin was produced by polymerase chain reaction (PCR) using the clone IRATp970B0778D (ImaGenes) as a template and the following pair of oligonucleotide primers: forward: 5'- GCAACTAGTATG ACTTCGGCAAC-3' and reverse: 5'- TGCAAGCTTCTAGAAGGAATCCATT GC-3'. After digestion with SpeI and HindIII, the PCR fragment was inserted into the plasmid pET41c (Novagen) to elaborate the vector pET41c- α -catenin coding for human α -catenin fused with an N-terminus GST (GST- α -catenin)(126.5 kDa). Prior to the expression of the proteins, the cDNA constructs were sequenced to verify that no mutation has arisen during PCR.

To produce His-EPLIN, GST- α -catenin and GST proteins, the *E. coli* BL21 RIL or BL21-DE3 strains (Stratagene) were transformed with the plasmids pQE30-EPLIN α , pET41c- α -catenin and pET41c, respectively. When the absorbance of the cultures reached 0.6-0.7 at 600 nm, the production of His-EPLIN, GST- α -catenin and GST proteins was induced by respectively adding to bacterial cultures 0.5 mM, 1 mM or 10 μ M IPTG and was completed within 3 hours. After a 20 min centrifugation at 5000 rpm, bacteria were collected and resuspended in sonication buffer [50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 6 mM of the reducing agent Tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP)]. Following sonication, the three recombinant proteins were soluble. Consequently, after a 30 min sonicated lysate centrifugation at 14 000 rpm, pellets were discarded and the supernatants were collected prior to be loaded onto glutathione-Sepharose columns (GE HealthCare) for GST- α -catenin and GST or on a Nickel-chelating column (Qiagen) for His-EPLIN. The recombinant proteins were eluted from the affinity columns according to the manufacturer's protocols.

The plasmid encoding for VE-Cad-GFP was previously described (21).

RNA extraction and analysis-Total RNA was extracted from HUVEC using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel). cDNAs were generated by reverse transcription using the Super Script first strand synthesis system (Invitrogen) under conditions recommended by the manufacturer. RT-PCR was performed with the equivalent of 20 ng reverse-transcribed RNA using the AccuPrime™ Taq DNA polymerase (Invitrogen) according to the parameters given in **Table II**. The oligonucleotide primers used are listed in **Table I**. Specific VE-cad, EPLIN and Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase (HPRT) PCR products were visualized by ethidium bromide staining.

Cell culture and transfection-Culture conditions for Caco2, MDCK, EAhy926 (EAHY) and hCMEC/D3 (HCMEC) (22) cell lines and for HUVEC are summed up in **Table III**. α MEM, DMEM, non essential amino acids and Low Serum Growth Supplement (LSGS) were from Invitrogen. Foetal Calf Serum (FCS), EBM-2, EGM-2 SingleQuots were from Lonza and the Antibiotic-Antimycotic solution (ATAM) from PAA Laboratories. HUVECs were transfected using nucleofection (Amaxa Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the day before transfection, cells were seeded at a density ranging 30 000 cells/cm² in EBM-2 medium supplemented with EGM-2 SingleQuots. For each siRNA transfection, 2.10⁶ cells were harvested using Reagent Pack (Cambrex) and pelleted by centrifugation (6 minutes at 1000 rpm) prior to be resuspended in 100 μ l of Nucleofector® solution, mixed with 6 μ l of siRNA at 20 μ M and subjected to nucleofection. siRNA-transfected cells were used at 24h or 48h after transfection.

For FRAP experiments, HUVECs were simultaneously transfected with the

plasmid coding VE-cad-GFP and siRNA using the nucleofection method.

Cell lysis and Western-blot analysis-HUVEC monolayers were rinsed in Ca^{2+} -, Mg^{2+} -containing PBS and resuspended in lysis buffer [50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP 40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptine, 2 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 2 mM PMSF and 1 mM Na_3VO_4] as previously described for epithelial cells (18). Cell lysates were collected and centrifuged at 15000g for 10 min at 4°C. Protein concentration in cell lysates was determined with a Micro-BCA kit (Pierce) using BSA as a standard. Protein extracts were resolved in MOPS buffer (Biorad) on pre-cast Criterion™ XT 4-12 % gradient Bis-Tris gels (BioRad) under reducing conditions and electro-transferred onto Immobilon®-P transfer membrane (Millipore). After a blocking step with 5% non fat dry milk, proteins were detected by specific primary antibodies as specified and the appropriate horseradish-peroxydase-conjugated goat anti-mouse or goat anti rabbit immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch). When mentioned, signal was quantified using ImageJ software.

Immunoprecipitation experiments-2 mg of total lysates were precleared on Protein A- (Sigma) or Protein G-Sepharose (Sigma) beads for immunoprecipitation experiments performed either with polyclonal or monoclonal antibodies, respectively. Precleared lysates were then incubated with 6 μg of specific antibody or non immune IgG at 4°C for 2h under agitation. Beads were then added for additional 2h at 4°C under agitation and washed three times in washing buffer [50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP 40 and 10% glycerol] prior to be resuspended in Laemmli buffer. After bead centrifugation, supernatants were then analysed on pre-cast Criterion™ XT 4-12 % gradient Bis-Tris gels (BioRad).

Subcellular fractionation-Membrane and cytosolic fractions were separated from HUVEC lysates by ultracentrifugation as previously described (23).

Calcium switch experiments-HUVECs, grown in EBM-2 supplemented with EGM-2 SingleQuots (Clonetics) until confluency, were rinsed with Ca^{2+} - Mg^{2+} -free PBS and incubated in complete EBM-2 medium with 2mM EGTA for 36 hours prior to be switched back to complete EBM-2 medium for the indicated time.

Immunofluorescence microscopy-For immunostaining, cells cultured on glass coverslips were rinsed several times in Ca^{2+} -, Mg^{2+} -containing PBS, fixed for 10 minutes at 37°C in 4% PFA and permeabilized in 4% PFA containing 0.5% Triton-X100 for 5 minutes at room temperature. After a blocking step in 2% BSA, cells were incubated with the primary antibody for one hour and subsequently with the appropriate secondary antibody for 45 minutes. Nucleus was stained with Hoechst dye prior coverslip mounting on slide using FluorSave™ Reagent (Calbiochem). An Axioplan 2 microscope (Zeiss) equipped with a x100 or x50 objective was used for cells observation. Images were captured with an AxioCam MR camera using Axiovision software. When specified, images were acquired using a confocal microscope TCS-SP2 (Leica) with a x 63/1.4 objective.

Pull-down assays-For GST-pull-down assays, 50 μl of glutathione-beads coupled with GST or GST- α -catenin were incubated overnight at 4°C with 50 μl of His-EPLIN in presence of 2% BSA (Bovine Serum Albumin) or 2 mg of HUVEC total lysate. After three washing steps with Tris 50 mM, NaCl 150 mM, proteins were eluted with 10 mM glutathione and analyzed on 4-12% gradient gel.

Immunofluorescent staining of VE-Cad, EPLIN and α -catenin in matrigel matrix was performed following in-gel fixation and permeabilization of tubules

using PBS containing 0.5% Triton X100 and 4% paraformaldehyde.

In vitro proliferation assay- Proliferation assays were performed using 96 well plates pre-coated overnight with 7 $\mu\text{g/ml}$ fibronectin and blocked with PBS-BSA 2% for 2 hours. 24 h after siRNA transfection, HUVECs were seeded at a density of 15 000 cells/well using 8 wells per condition. After 24 and 48 h incubation times, cells were fixed by adding 150 mM NaCl-containing Percoll (100 $\mu\text{l/well}$) and 10% glutaraldehyde-containing Percoll (50 $\mu\text{l/well}$). Cells were rinsed in PBS before staining with 0,1%(w/v) crystal violet. After extensive washing, coloured cells were lysed in 0,2% Triton X100. Cell density was quantified by measuring absorbance of the resulting solutions at 560 nm using a BioRad microplate reader.

In vitro adhesion assay-Cellular adhesion was assessed using 96 well plates pre-coated overnight with 0, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ of fibronectin. HUVECs were then seeded in serum-free medium at a density of 30 000 cells/well and incubated 15 minutes at 37°C to allow cell-matrix adhesion. An extensive and vigorous washing step with PBS was performed to remove non adherent cells. As for proliferation assay, cells were fixed in 150 mM NaCl-containing Percoll and 10% glutaraldehyde-containing Percoll, rinsed in PBS before staining with 0,1%(w/v) crystal violet. Coloured cells were lysed in 0,2% Triton X100 and cell density was quantified by measuring absorbance of the resulting solutions at 560 nm using a BioRad microplate reader.

In vitro wounding migration assay-24h after cell seeding in 2 well-Labtek (Nunc), siRNA control and siRNA EPLIN-treated HUVEC monolayers were scratched with a tip to obtain a linear wound. Reclosure of the wound was monitored by time lapse microscopy under low magnification (4X) until cells reconstituted homogenous monolayers. Distances covered by the migration fronts were measured at 20

different points along the wound using ImageJ software.

In vitro tubule formation assay-The angiogenic impact of EPLIN extinction was assessed using Matrigel angiogenesis assay. 50 $\mu\text{l/cm}^2$ of Matrigel were plated into 2 wells Labtek (Nunc) and maintained at 37°C for 30 minutes to induce gel polymerization. Then, 50 000 cells/ cm^2 , counted with the Scepter Handheld automated Cell Counter (catalog # PHCC00000, Millipore), were seeded onto the Matrigel layer. Formation of tubes was visualized by time lapse microscopy under low magnification (4X) for 26h. Total length of vascular capillary network was quantified using the ImageJ software.

FRAP experiments-For VE-cad-GFP FRAP and spot tracking, images were acquired using a Zeiss Confocor microscope equipped of a plan apochromat 100x oil objective (numerical apperture of 1.4). Photobleaching was performed using the 488 nm line of an Argon laser. The size of the spot was 0.8 μm^2 . Fluorescence recovery was then recorded every 3 s during 150 s over regions of interest (ROI) of 180x100 pixels (9 x 3.6 μm^2), centered on the spot and oriented parallel to the adherens junctions. Lateral movements of the junctions were compensated using Stackreg plugin of ImageJ software. Using ImageJ software, the bleached intensity was calculated as the mean intensity in a 0.8 μm^2 disk, centered on the bleach spot. This intensity was then normalized by the mean intensity of the whole ROI, excluding a 2.54 μm^2 circular region centered on the bleached spot. The normalized intensity of the 2 prebleached time points were averaged to obtain a prebleached intensity reference. The time points were then expressed as a percentage of the prebleached intensity. Normalization by the mean intensity of the adherent junction, excluded of the bleach spot (24), was also tested. No significant difference with the previous method was observed, except that it is more sensitive

to cell movements. Data were fitted using a diffusion dominant model (25).

Time-lapse videomicroscopy-Time-lapse videomicroscopy experiments were performed on siRNA control- and siRNA EPLIN-treated HUVECs grown in 2 well-Labtek. Images were collected with an IX71 Olympus microscope equipped with a heating workplate, a humidifier and a

CO₂ delivery system and using an UPlan FLN $\times 4/0.13$ PhL objective and an ORCA-ER camera (Hamamatsu). Microscope was also equipped with a motorized stage (Märzhäuser GmbH and Prior Scientific Instruments Ltd) to allow multi-position and multi-condition acquisition and automated experiments.

RESULTS

EPLIN is expressed in endothelial cells at intercellular junctions. In epithelial cells, EPLIN was recently shown to link actin filaments to α -catenin when bound to the E-cadherin/ β -catenin complex (18). Since EPLIN expression was only reported in epithelial cells, we first investigated whether EPLIN was also present in endothelial cells. RT-PCR analysis revealed the existence of an EPLIN transcript in HUVECs (Fig 1A). The presence of both EPLIN α and β proteins was detected by Western blot analysis in the endothelial Eahy-926, HCME and HUVE cell types (Fig1B). However, while EPLIN α and β isoforms were expressed in similar amounts in MDCK and Caco2 epithelial cell lines, significantly lower EPLIN β protein levels were detected in endothelial cells, particularly in Eahy-926 cell line (Fig1B). To test whether EPLIN is able to promote interaction between the endothelial catenin-cadherin complex and F-actin as it does in epithelial cells, its subcellular localization was explored in HUVECs. The membrane and cytoplasmic fractions were separated from HUVEC lysates by ultracentrifugation and analyzed for their EPLIN content by Western blot (Fig 1C). Similar to α -catenin, EPLIN was preferentially detected in the membrane fraction compared to the cytoplasmic fraction (Fig 1C). An immunocytochemical localization of EPLIN was also carried out on HUVECs plated at different densities. Fig2 shows that EPLIN was mainly located along actin

stress fibers in sparse cells, while it accumulated along cortical actin ring in confluent monolayers. Similar results were obtained with HCMEC, Eahy926, Caco2 and MDCK cells, (Fig3A). Furthermore, EPLIN co-localized with α -catenin at cell-cell junctions in all cell types. (Fig3B). Confocal microscopy further confirmed that EPLIN, α -catenin together with actin co-localized at cell-cell junctions. The three signals were present all along the intercellular junctions in the Z-axis. In addition, after a careful scrutiny of confocal images, we observed that whenever EPLIN was located at cell-cell junctions, it appeared co-localized with α -catenin and actin. However, junctional α -catenin could be co-localized with actin in spots without EPLIN. These data led us to think that EPLIN could be one of the missing links between the VE-cad based complex and the cortical actin filaments.

Association of EPLIN with the VE-cadherin-catenin complex in HUVECs. To assess whether EPLIN is associated with the VE-cad/catenin complex in HUVECs, various immunoprecipitation experiments were performed (Fig4). In a first series of experiments we show that α - and β -catenin, as well as VE-cadherin were co-immunoprecipitated with EPLIN. Interestingly, only the entire form of VE-cadherin at 135 kDa and not the intracellularly truncated 100 kDa form (VE-cadtr) (Fig4B) was immunoprecipitated indicating that VE-cadherin cytoplasmic tail is necessary for its participation to the complex.

Immunoprecipitations of α -catenin (**Fig4C**), β -catenin (**Fig4D**) or VE-cad (**Fig4E**) confirmed the association of EPLIN with α - and β -catenins and with VE-cad. To verify immunoprecipitation data, GST-pull-down assays were performed using α -catenin N-terminally-coupled to GST (GST- α -catenin). Pull-down assays, performed with HUVEC extracts, revealed that GST- α -catenin interacted with both α and β isoforms of endogenous EPLIN whereas GST did not (**Fig4F**). To determine whether α -catenin is the element within the VE-cad-catenin complex that directly binds EPLIN, the GST- α -catenin fusion protein was assayed for its capacity to bind the purified recombinant EPLIN fused with a polyhistidine tag (His-EPLIN). As illustrated in **Fig4G**, GST- α -catenin precipitated His-EPLIN whereas GST did not. These data indicate that, in HUVEC, EPLIN associates with the VE-cad-catenin complex via α -catenin.

Differential recruitment of EPLIN and α -catenin to newly formed cell-cell contacts. Recruitment of EPLIN and α -catenin in the formation of cell-cell contacts was then investigated. Consequently, to initiate cell-cell contacts, HUVECs were treated by EGTA (for 36 h) and then switched to standard Ca^{2+} conditions. At different post- Ca^{2+} addition times, HUVECs were co-labelled for EPLIN and α -catenin (**Fig5**). In low Ca^{2+} -containing medium, EPLIN was clearly detected at cell edges but also along some actin fibers (**Fig5D**) whereas α -catenin appeared cytoplasmic and mainly concentrated at the perinuclear region (**Fig5E**). After cell-cell adhesion was stimulated by calcium addition, EPLIN reproducibly accumulated at contact sites (**Fig5G and J**). In comparison, recruitment of α -catenin at cell-cell contacts was clearly delayed. Hence, at 60 min post- Ca^{2+} addition time, EPLIN staining exhibited a continuous thin line at cell-cell contacts (**Fig5J**), while α -catenin

was essentially cytoplasmic with only a faint and discrete localization at cell-cell adhesion sites (**Fig5K**). While EPLIN localized at cell edge before the initiation of cell-cell adhesion, α -catenin was recruited temporally.

EPLIN abrogation does not affect HUVEC proliferation, adhesion and migration. To progress in our understanding of the role of EPLIN at cell-cell junctions, abrogation of EPLIN was carried out in HUVEC using siRNA technology. We first established the time course of EPLIN down regulation in HUVECs treated with EPLIN siRNA. Practically, immediately after siRNA transfection, HUVECs were plated and allowed to grow for additional 24, 48 or 72 h periods of time prior to cell lysis. Western blot analysis indicated that at 24 h post-transfection, EPLIN expression was 80% lower compared to control siRNA (**Fig6A and B**). Between 48 h and 72 h post transfection, EPLIN expression progressively re-increased (**Fig6A and B**). To test whether EPLIN silencing influenced the expression of VE-cad and α -catenin, Western blot analyses were carried out on EPLIN siRNA-treated HUVECs. **Fig6C** shows that the levels of VE-cad and α -catenin protein expression were unaffected by EPLIN knockdown.

To investigate whether EPLIN depletion disrupts cell-cell adhesion and/or alters cell morphology, siRNA-treated HUVEC monolayers were labelled for EPLIN, α -catenin and VE-cad. Down regulation of EPLIN affected neither the distribution of α -catenin (**Fig7A**) and VE-cad (**Fig7B**) at sites of cell-cell contacts nor cell morphology (**Fig7A and B**). By contrast, abrogation of EPLIN expression in HUVECs disturbed the organization of cortical F-actin. At confluency, control siRNA-treated HUVECs exhibited cortical F-actin organized along the adhesion belt (**Fig7C, arrows**). By contrast, EPLIN depletion led to a phalloidin staining decrease of the cortical actin ring with formation of gaps within the actin

cytoskeleton network of adjoining cells (**Fig 7C**, arrow-heads). In addition, residual cortical actin bundles bridged adjacent cells by adopting a radial orientation. These features suggest that EPLIN is absolutely required for the elaboration of the cortical F-actin belt. Interestingly, EPLIN depletion led to an increase in actin stress fibers (**Fig. 7C**).

No defect in cell growth rate was observed between siRNA control and siRNA EPLIN-treated cells at 24 h and 48 h incubation times (**Fig8A and B**). Moreover, quantification of endothelial cell adhesion to fibronectin-coated surface revealed that the number of adhering siRNA-treated cells increased with the level of coated fibronectin but were unaffected by EPLIN depletion (**Fig8C and E**).

Next, we tested whether EPLIN knock-down would have an impact on endothelial migration post-injury. Endothelial monolayers transfected with control or EPLIN siRNA were subjected to a wound-repair assay and time-lapse imaging was employed to document wound closure over time (**Fig8D**). For both control- and EPLIN-siRNA-treated monolayers wound closure was completed by 11 h post-injury. Distances covered by the cell fronts were plotted versus time and the rates of wound closure indicate that HUVEC migration was not altered by EPLIN depletion (**Fig8F**). Moreover, automated single-cell tracking of scratched monolayers revealed that the trajectories of cells are not affected by EPLIN down-regulation (data not shown). In conclusion, EPLIN depletion does not modify the ability of HUVECs to proliferate, adhere and migrate.

EPLIN is not essential for the stability of mature VE-cadherin-mediated adhesion. To gain insights on the role of EPLIN in the dynamics of mature VE-cad adhesion, we performed fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments. For this, we transiently co-transfected HUVECs with the cDNA

plasmid coding VE-cad C-terminally fused with GFP (VE-cad-GFP) and with either control or EPLIN siRNA (**Fig9**). We characterized the dynamics of VE-cad-GFP localized to sites of cell-cell contacts in both siRNA control and siRNA EPLIN-treated HUVEC monolayers (**Fig9A**). For both siRNA-treated cells, fluorescence signals came back within 50 s and the mobile fraction was estimated to 75% of the total junctional VE-cad-GFP population (**Fig9B**). The mean diffusion coefficients of VE-cad-GFP, determined from 50 individual trajectories for each transfection condition, were estimated to $(5 \pm 1) \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for control- as well as for EPLIN-siRNA treated HUVECs. This value is consistent with data published on E-cad-GFP (**24**), GFP-N-cad (**26**) and cad-11-GFP (**27**) when involved in mature cell-cell contacts. The fact that VE-cad diffusion is not affected by EPLIN depletion suggests that the primary function of EPLIN is not to control VE-cad-mediated stability at adherens junctions.

Role of EPLIN in mechanotransduction. Vinculin is another actin-binding protein known to directly interact with α -catenin (**9,28-29**). To test whether EPLIN and vinculin can interact with VE-cad-bound α -catenin, their respective immunocytochemical localization was analyzed in HUVECs. **Fig 10A** showed that vinculin localized at both focal adhesion (arrow-heads) and cell-cell junction sites (arrows). As cell confluence increased, cell-cell junctions lost their zig-zag aspect and vinculin and EPLIN accumulated at cell-cell junctions. In fact, co-localization of EPLIN and vinculin appeared restricted to areas where cell-cell junctions were mature.

We next sought to determine whether vinculin and EPLIN are recruited at cell-cell junctions independently to each other. For this, the immunolocalization of vinculin was analyzed in EPLIN-depleted HUVECs. A clear delocalization of vinculin from cell-cell junctions was

observed in the absence of EPLIN in contrast to what happened in control siRNA-treated HUVEC (**Fig10B**). This observation indicates that the recruitment of vinculin at cell-cell junctions requires the presence of EPLIN.

Recently, it was discovered that vinculin reversibly disappeared from epithelial cell-cell junctions when force generated by myosin-II was inhibited with blebbistatin (**9**), a specific inhibitor of non-muscle myosin-II activity (**30**). To investigate whether EPLIN and vinculin are affected by actomyosin activity in HUVECs, we examined the junctional localization of EPLIN and vinculin in HUVECs treated during 30 min with different concentrations of blebbistatin (**Fig11**). In HUVECs treated with 0, 5, 10 and 50 μ M blebbistatin, EPLIN was nearly completely co-localized with α -catenin at cell-cell junctions in spite of the disturbing effects of blebbistatin on cell-cell junctions (**Fig11A**). In contrast, junctional vinculin staining was strikingly reduced in blebbistatin-treated HUVECs indicating that drug treatment caused a redistribution of vinculin from cell-cell junction (**Fig11B**). Together, these results indicate that, in HUVECs, EPLIN is present at cell-cell junctions independently of myosin II contractility whereas junctional localization of vinculin requires myosin-II activity.

To quantify the blebbistatin sensibility of the two junctional proteins vinculin and EPLIN, we determined the EPLIN/ α -catenin and vinculin/ α -catenin fluorescent intensity ratios at cell-cell junctions in blebbistatin-treated cells (**Fig12**). This quantification revealed a significant reduction in vinculin level after blebbistatin treatment (**Fig12C**). More precisely, the reduction reached 34% and 59% in HUVEC treated respectively with 5 and 10 μ M blebbistatin. Similar analysis revealed no significant difference in the junctional level of EPLIN between control and blebbistatin-treated HUVECs (**Fig12D**). This difference of behaviour

probably reflects the differential capacity of EPLIN and vinculin to interact with α -catenin.

Impact of EPLIN depletion on angiogenesis. We next wondered whether EPLIN depletion would impair more elaborate processes, such as *in vitro* angiogenesis, during which intracellular tensions, generated by the actin cytoskeleton and transmitted from cell to cell through adherens junctions, are required for proper vascular organization (**31**). To investigate the effect of EPLIN depletion on angiogenesis, *in vitro* tubule formation assays were performed using a Matrigel matrix onto which was seeded an equal number of HUVECs pre-treated with either EPLIN or control siRNA. Observation by phase contrast microscopy showed that control- and EPLIN-siRNA-transfected cells kept the capacity to elaborate pre-capillary structures. Immunostaining of these pseudo-vascular structures showed that EPLIN co-localized at cell-cell junctions with VE-cadherin (**Fig13A**) and α -catenin (**Fig14A**). Moreover, at EPLIN-null junctions, VE-cadherin and α -catenin immunofluorescent signals were still detectable indicating that EPLIN-depletion in pre-capillary structures did not affect the subcellular localization of VE-Cad (**Fig13B**) and α -catenin (**Fig14B**).

By time lapse microscopy, we noticed that a progressive formation of lacunae emerged from the organization of HUVECs initially homogeneously distributed on the Matrigel matrix (**Fig15A**). To temporally quantify the vascular network construction, the total length of capillaries was measured over time using Image J software. At 2 h post-seeding time, control and EPLIN-siRNA HUVECs exhibited preliminary capillary networks with equivalent total lengths prior undergoing powerful remodelling (**Fig15, 2h**). As illustrated for control-siRNA-transfected cells in **Fig15B**, this vascular network remodelling process

could be clearly divided into two phases. During the first phase (2-12 h), the lacunae grew and fused leading to an exponential decrease of the network length (**Fig15A**). In the second phase (12-26 h), the vascular network reached a steady state leading to a stabilization of the total capillary length. For EPLIN siRNA down-regulated HUVECs, a very similar decrease of the network length was observed during the 2-12 h post seeding period. But in contrast to what happened for control siRNA-treated cells during the second phase, network length continuously decreased with post-cell seeding time (**Fig15B**). We observed that internodal connections were lacking and a certain number of endothelial cells remained as single cells, unincorporated into any tubular structures or agglutinated into bunches at the tips of retracting tubes after their breakage (**Fig15A**, arrowhead). Compared to the preliminary networks, at 26 h post seeding time, control- and EPLIN- siRNA treated

cells showed a 43 and 70% decrease of total network length, respectively (**Fig15B**). Careful examination of the network generated from EPLIN-down regulated cells revealed that vascular capillaries underwent numerous breakage events (**Fig15A**, arrows). This led to concomitant lacuna surface growth and network length decrease. Quantification of the breakage events revealed that in the absence of EPLIN, pre-capillary network tended to break twice more than in control cells (**Fig15C**). We conclude that EPLIN-depleted HUVECs maintain their ability to elaborate preliminary vascular network, however, the vascular pseudo-capillaries regress during the remodelling process. As intercellular tensions increase during this latter step (31), this feature possibly reflects an alteration in the link between the VE-cad-catenin complex and the cortical actin ring as previously observed in HUVECs seeded on fibronectin-coated dishes.

DISCUSSION

There is growing evidence that cells and tissues are submitted to intercellular forces during cell remodelling and tissue morphogenesis (46). This mainly occurs through adherens junctions, mostly by cadherins and suggests that cadherin complex is physically and mechanically coupled to the actin cytoskeleton (32), (24). The traditional view proposing that cadherin-catenin complexes are directly anchored to F-actin through α -catenin has been recently contested, convincing data proving that α -catenin cannot simultaneously bind to cadherin- β / γ -catenin complex and actin (6)-(7). To encompass all these observations, it could be assumed that some mediators are able to bridge cadherin-catenin complex to F-actin. This view correlates with the discovery that an increasing number of actin-associated proteins such as vinculin (33), α -actinin (8) (34), formin (35) and Ajuba (36) are

able to associate with α -catenin. By directly associating with α -catenin, vinculin (28) and Ajuba (36) contribute to the bridging of E-cadherin adhesive complexes to the cortical actin cytoskeleton in epithelial cells. Through these different types of connections, α -catenin can associate with various actin structures. In a recent study, EPLIN was described as a novel mediator able to couple E-cadherin-catenin to F-actin (18) but whether this occurs in endothelial intercellular junction needs to be explored.

Until now, EPLIN (Epithelial Protein Loss In Neoplasm) has been considered as an epithelial protein down-regulated in many epithelial cancer cell lines. In the present manuscript, we show that EPLIN mRNA and EPLIN α and β proteins are also present in HUVECs. Additionally, we observed that EPLIN α protein is expressed at comparable levels in epithelial and in endothelial cells of

venous or microvascular origin. Altogether, these findings contradict previous reports that mentioned no or only weak expression of EPLIN at mRNA and protein levels in arterial (37) and venous (15) (12) endothelial cells. We also found that EPLIN β protein is less expressed in endothelial cells. As isotypes α and β are generated by two independent promoters, it is thus likely that *EPLIN* β promoter is differentially regulated in epithelial and endothelial cells (38).

Our first investigations on EPLIN subcellular localization in confluent HUVECs showed that EPLIN is mostly associated to the plasma membrane and more particularly at cell-cell junctions where it co-localizes with α -catenin in agreement with a recent study on epithelial cells (18). Previous reports mentioned that EPLIN is predominantly distributed along actin stress fibers in U2OS osteosarcoma (39), primary osteoblasts (16) and EPLIN-overexpressing NIH 3T3 (16). Similarly, in sparse HUVECs, EPLIN is mainly localized along stress fibers, consistent with the idea that it is an actin-binding protein (12).

Our data also highlight an association between VE-cad and EPLIN. Direct interaction of EPLIN and α -catenin was subsequently attested by *in vitro* binding of His-EPLIN and GST- α -catenin and by co-immunoprecipitation experiments using HUVECs. Additionally, we proved that EPLIN associates with α -catenin tethered to the VE-cadherin adhesive complex. Thus, these data provide evidence that EPLIN participates in the linkage of the VE-cad-catenin complex to the cortical actin fibers via α -catenin and also predict that EPLIN functions similarly in endothelial cells and in epithelial cells (18). In Ca^{2+} switch experiments, EPLIN and α -catenin exhibited distinct cellular localization in low Ca^{2+} -containing medium. While EPLIN was located at cell-cell junctions and on stress fibers, α -catenin was concentrated at the perinuclear region.

Ca^{2+} addition induced α -catenin recruitment at interendothelial junctions as previously described for VE-cad (40). Once positioned, α -catenin may interact with EPLIN already present at cell-cell junctions. Thus, α -catenin might be the last element that fills the gap between the VE-cadherin complex and the actin-filament-EPLIN network.

Downregulation of EPLIN was described in many cancer-derived or transformed cells and it was proposed that EPLIN could act as a tumour suppressor (12) (15). Overexpression of EPLIN in some transformed cells reverses their capacity to grow in an anchorage-independent way, indicating that EPLIN may function in growth control by associating with and regulating the actin cytoskeleton (39). Herein, to gain insights on the role of EPLIN in the endothelium, its expression was blocked by siRNA in HUVECs. EPLIN silencing did not affect VE-cad and α -catenin expression.

Neither the adhesive nor the proliferative properties of HUVECs appeared affected by EPLIN silencing. In addition, EPLIN depletion had no impact on the rates of wound closure, the migration capacity of EPLIN-silenced cells remaining intact. This is not in agreement with previous data indicating that EPLIN ectopic expression decreases motility and cell-matrix adhesion of human endothelial HECV cells (37). This discrepancy may issue from differences in experimental procedures. In one case, EPLIN α was forcibly induced in HECV human endothelial cell line while we used EPLIN silencing by siRNA in HUVE primary cells.

However, in the absence of EPLIN we observed a deficit of connections between cell-cell junctions and F-actin. EPLIN depletion created gaps within actin cortical network of adjacent cells. This probably reflects the defect in vinculin recruitment observed at cell-cell junctions in EPLIN-silenced HUVEC.

EPLIN is recruited at endothelial cell-cell junctions without requiring actomyosin contractility (**Fig11A**). This feature demonstrates the capacity of EPLIN to interact with the closed conformation that α -catenin adopted in the absence of myosin II-mediated contractility. By contrast, vinculin escapes from endothelial cell-cell junctions when tension exerted by the actomyosin cytoskeleton is reduced (**Fig11B**). This is in agreement with previous work showing that vinculin preferentially interacts with the stretched conformation of α -catenin at epithelial cell-cell junctions (9). We propose a model (**Fig16**) in which EPLIN primarily connects the VE-cadherin-catenin complex to F-actin by interacting with the closed conformation of α -catenin. Then, because of the forces applied by the actin filaments-EPLIN network, α -catenin adopts a stretched conformation unmasking a cryptic binding domain for vinculin. Depending on the tension amplitude exerted by the cytoskeleton, we observed that cell-cell junctions recruit variable amounts of vinculin. Vinculin which also exhibits open and closed conformations (41-42) may induce sequential recruitment of additional actin binding proteins. Consequently, by acting in concert, EPLIN and vitronectin reinforce the connections of the VE-cadherin complex to the actin filaments. The multiplicity of connections between the two entities is likely at the basis of adherens junction strengthening.

In Matrigel assays using EPLIN-silenced HUVECs, we observed that pre-capillary network formed normally despite EPLIN down regulation. This implies that EPLIN does not interfere with the early steps of the angiogenic process and correlates with the fact that cell-matrix and cell-cell adhesions are unaltered in EPLIN-silenced HUVECs. By contrast, during the later step of tube formation, there is a marked alteration of *in vitro* morphogenesis. Upon EPLIN depletion, decrease of internodal connections and

regression of the vascular network occur resulting from an increase of breakage events within the capillary network. Our immunolabelling data excluded the possibility that VE-cadherin and α -catenin could be delocalized from cell-cell junctions. To explain these breakages, we hypothesised that EPLIN depletion would impair intercellular adhesion by increasing mobility of VE-cadherin molecules decoupled from the actin cytoskeleton. Surprisingly, FRAP experiments revealed no difference in VE-cadherin mobility in presence and absence of EPLIN. Altogether, these results indicate that neither the mobility nor the junction stability was affected by EPLIN depletion.

Finally, we suspected that breakages undergone by pre-capillary structures result from the reduced density of F-actin anchored to adherens junctions. This defect should render cell-cell junctions more sensitive to forces exerted directly perpendicular to the cell-cell interface (44-45).

In conclusion, our data indicate that EPLIN participates in a two-tiered mechanism leading to optimal interaction between the adherens junctions and the actin cytoskeleton. In this context, the EPLIN- α -catenin link provides a mechanosensory machinery by acting as a tension transmitter. This machinery is required for *in vitro* vascular morphogenesis. As tumor angiogenesis has become a major target of anticancer therapies, the understanding of a novel mechanism of vessel formation, may have clinical significance.

REFERENCES

1. Aird, W. C. (2007) *Circ Res* **100**, 174-190
2. Liebner, S., Cavallaro, U., and Dejana, E. (2006) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1431-1438
3. Vestweber, D. (2008) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 223-232
4. Gavard, J. (2009) *FEBS Lett* **583**, 1-6
5. Shapiro, L., and Weis, W. I. (2009) *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a003053
6. Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (2005) *Cell* **123**, 903-915
7. Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., and Nelson, W. J. (2005) *Cell* **123**, 889-901
8. Nieset, J. E., Redfield, A. R., Jin, F., Knudsen, K. A., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. (1997) *J Cell Sci* **110** (Pt 8), 1013-1022
9. Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010) *Nat Cell Biol* **12**, 533-542
10. Vestweber, D., Winderlich, M., Cagna, G., and Nottebaum, A. F. (2009) *Trends Cell Biol* **19**, 8-15
11. Chang, D. D., Park, N. H., Denny, C. T., Nelson, S. F., and Pe, M. (1998) *Oncogene* **16**, 1921-1930
12. Maul, R. S., and Chang, D. D. (1999) *Oncogene* **18**, 7838-7841
13. Zheng, Q., and Zhao, Y. (2007) *Biol Cell* **99**, 489-502
14. Maul, R. S., Song, Y., Amann, K. J., Gerbin, S. C., Pollard, T. D., and Chang, D. D. (2003) *J Cell Biol* **160**, 399-407
15. Jiang, W. G., Martin, T. A., Lewis-Russell, J. M., Douglas-Jones, A., Ye, L., and Mansel, R. E. (2008) *Mol Cancer* **7**, 71
16. Han, M. Y., Kosako, H., Watanabe, T., and Hattori, S. (2007) *Mol Cell Biol* **27**, 8190-8204
17. Chircop, M., Oakes, V., Graham, M. E., Ma, M. P., Smith, C. M., Robinson, P. J., and Khanna, K. K. (2009) *Cell Cycle* **8**, 757-764
18. Abe, K., and Takeichi, M. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13-19
19. Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (1995) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1229-1239
20. Almagro, S., Durmort, C., Chervin-Petiot, A., Heyraud, S., Dubois, M., Lambert, O., Maillefaud, C., Hewat, E., Schaal, J. P., Huber, P., and Gulino-Debrac, D. (2010) *Mol Cell Biol* **30**, 1703-1717
21. Delanoe-Ayari, H., Al Kurdi, R., Vallade, M., Gulino-Debrac, D., and Riveline, D. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A*
22. Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. A., and Couraud, P. O. (2005) *FASEB J* **19**, 1872-1874
23. Heyraud, S., Jaquinod, M., Durmort, C., Dambroise, E., Concord, E., Schaal, J. P., Huber, P., and Gulino-Debrac, D. (2008) *Mol Cell Biol* **28**, 1657-1668
24. Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P. F., and Lecuit, T. (2008) *Nature* **453**, 751-756
25. Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. W. (1976) *Biophys J* **16**, 1055-1069

26. Comunale, F., Causeret, M., Favard, C., Cau, J., Taulet, N., Charrasse, S., and Gauthier-Rouviere, C. (2007) *Biol Cell* **99**, 503-517
27. Kiener, H. P., Stipp, C. S., Allen, P. G., Higgins, J. M., and Brenner, M. B. (2006) *Mol Biol Cell* **17**, 2366-2376
28. Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E. D., and Takeichi, M. (1998) *J Cell Biol* **142**, 847-857
29. Weiss, E. E., Kroemker, M., Rudiger, A. H., Jockusch, B. M., and Rudiger, M. (1998) *J Cell Biol* **141**, 755-764
30. Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., and Mitchison, T. J. (2003) *Science* **299**, 1743-1747
31. Stephanou, A., Meskaoui, G., Vailhe, B., and Tracqui, P. (2007) *Microvasc Res* **73**, 182-190
32. Smutny, M., and Yap, A. S. (2010) *J Cell Biol* **189**, 1075-1077
33. Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S., and Nagafuchi, A. (1999) *J Cell Biol* **144**, 1311-1322
34. Harris, E. S., and Nelson, W. J. (2010) *Curr Opin Cell Biol* **22**, 651-658
35. Kobielak, A., Pasolli, H. A., and Fuchs, E. (2004) *Nat Cell Biol* **6**, 21-30
36. Marie, H., Pratt, S. J., Betson, M., Epple, H., Kittler, J. T., Meek, L., Moss, S. J., Troyanovsky, S., Attwell, D., Longmore, G. D., and Braga, V. M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 1220-1228
37. Sanders, A. J., Ye, L., Mason, M. D., and Jiang, W. G. (2010) *Angiogenesis* **13**, 317-326
38. Chen, S., Maul, R. S., Kim, H. R., and Chang, D. D. (2000) *Gene* **248**, 69-76
39. Song, Y., Maul, R. S., Gerbin, C. S., and Chang, D. D. (2002) *Mol Biol Cell* **13**, 1408-1416
40. Liao, F., Doody, J. F., Overholser, J., Finnerty, B., Bassi, R., Wu, Y., Dejana, E., Kussie, P., Bohlen, P., and Hicklin, D. J. (2002) *Cancer Res* **62**, 2567-2575.
41. Mierke, C. T. (2009) *Cell Biochem Biophys* **53**, 115-126
42. Carisey, A., and Ballestrem, C. (2010) *Eur J Cell Biol*
43. Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K., and Benton, G. (2009) *Angiogenesis* **12**, 267-274
44. Maruthamuthu, V., Sabass, B., Schwarz, U. S., and Gardel, M. L. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4708-4713
45. Liu, Z., Tan, J. L., Cohen, D. M., Yang, M. T., Sniadecki, N. J., Ruiz, S. A., Nelson, C. M., and Chen, C. S. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9944-9949
46. Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D. M. (2005) *Curr Opin Genet Dev* **15**, 102-111
47. McDonald, D. M., and Baluk, P. (2005) *Chest* **128**, 602S-608S

FIGURE LEGENDS

Fig.1. EPLIN expression in epithelial and endothelial cells. **A.** RT-PCR analysis of *EPLIN* and *VE-cadherin* mRNAs in HUVECs. *EPLIN* (lane 1), *HPRT* (lane 2), *HPRT* and *VE-cad* (lane 3), *HPRT* and *EPLIN* (lane 4) mRNAs were converted into cDNAs prior to be used as templates for subsequent PCR amplification. *VE-cad* was used as a positive control and *HPRT* as an internal standard. Negative control was performed with no template (lane 5). **B.** Western blot analysis of EPLIN expression in Caco2, MDCK, Eahy, HCMEC and HUVEC lysates. Membrane was re-probed with anti- β -tubulin antibody for protein loading control. **C.** Western blot analysis of the subcellular localization of EPLIN and α -catenin proteins in

confluent HUVECs. The membrane (Mb) and cytoplasmic (Cyto) fractions were separated from HUVEC lysates by ultra-centrifugation and then analyzed by Western-blot for their EPLIN and α -catenin contents. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of each blot.

Fig. 2. Differential distribution of EPLIN in sparse and confluent HUVECs. HUVECs were plated on glass coverslips at two different densities and stained with anti-EPLIN antibody, FITC-phalloidin and Hoechst. Bar: 20 μ m.

Fig.3. Subcellular localization of EPLIN and α -catenin in endothelial and epithelial cells. *A.* Caco2, MDCK, Eahy, HCME and HUVE cells were immunolabelled for EPLIN and α -catenin. Scale bar = 20 μ m. *B.* Confocal analysis of α -catenin, EPLIN and F-actin on Caco2 and HUVEC monolayers. White lines reflect plan for Z acquisition. Scale bar = 20 μ m.

Fig. 4. Association of EPLIN with the VE-cadherin based complex in HUVEC. Co-immunoprecipitations of EPLIN with VE-cad, α - and β -catenins in HUVECs. Anti-EPLIN (B), α -catenin (C), β -catenin (D) and VE-cad (E) immunoprecipitations (IP) were probed successively for EPLIN, α -catenin, β -catenin and VE-cad. As controls, the whole cell lysate (Lys) was run in parallel (A) and the IPs performed using rabbit (negative control for anti-EPLIN, anti- α -catenin and anti-VE-cad IPs) or mouse (negative control for anti- β -catenin IP) non-immune IgG (NI) were analyzed simultaneously. Note that in Panel B, IPs, performed using the rabbit anti-EPLIN antibody, were probed with the mouse anti-EPLIN antibody. *, non specific band revealed by mouse anti-EPLIN antibody. VE-Cadtr corresponds to a truncated form of VE-Cad cleaved at its C-terminus and deleted of the catenin binding domains (18). *F.* Interaction of α -catenin with EPLIN. GST or GST- α -catenin immobilized on glutathione beads were incubated with HUVEC lysates. Pull-down assays and whole HUVEC lysate were revealed with the mouse anti-EPLIN antibody. *G.* Direct interaction between purified EPLIN and α -catenin. Purified His-EPLIN was incubated with purified GST or GST- α -catenin immobilized on glutathione beads as indicated. Pull-down assays and whole HUVEC lysate were revealed with the mouse anti-EPLIN antibody.

Fig. 5. Differential recruitment of EPLIN and α -catenin to newly formed cell-cell contacts in HUVECs. HUVECs were cultured for 36 hours in the presence of either 2 mM EGTA (low calcium) or Ca^{2+} (Control). HUVECs grown in EGTA-containing medium were switched from low Ca^{2+} to standard Ca^{2+} conditions. Cells were fixed and stained for EPLIN (A, D, G and J) and α -catenin (B, E, H and K) in normal Ca^{2+} conditions (A, B and C), in low Ca^{2+} conditions (D, E and F), or 10 minutes (G, H and I) and 60 minutes after the Ca^{2+} switch (J, K and L).

Fig. 6. Transient depletion of EPLIN in HUVECs. *A.* Western blot analysis of EPLIN protein expression in siRNA-treated HUVECs. Lysates of HUVECs transfected with control (Ctrl) or EPLIN siRNA were analyzed by Western blot to determine EPLIN α and β protein levels. Immunoblots were re-probed with β -tubulin for protein loading control. *B.* Efficiency of EPLIN extinction at 24, 48 and 72 h post siRNA transfection times. Evaluation of the residual amounts of EPLIN was obtained from quantification of the immunoreactive bands after normalization to β -tubulin using ImageJ software. *C.* Western blot analysis of VE-cadherin, α -catenin and tubulin protein expression levels in HUVECs transfected with control- (siCtrl) and EPLIN- (siEPLIN) siRNA. Lysates of siRNA-treated HUVECs were probed successively for EPLIN, VE-cad, α -catenin (α -cat) and β -tubulin (β -tub). β -tubulin expression was monitored for normalization of protein loading.

Fig 7. Immunofluorescence analysis of EPLIN, α -catenin, VE-cad and actin distributions in siRNA-treated confluent HUVECs. 24 h after transfection with control (Ctrl) or EPLIN siRNA, HUVECs were stained for EPLIN, α -catenin and nuclei (Hoechst) (A), for EPLIN, VE-Cad and nuclei (B) and for EPLIN, actin and nuclei (C). In panel C, arrows point out to cortical F-actin (above) and arrow-heads for gaps within cortical F-actin network (below). Confocal images are representative of at least three independent experiments. Scale bar: 10 μ m.

Fig. 8. Effect of EPLIN depletion on *in vitro* proliferation, adhesion and wound healing assays. *A.* and *B.* *in vitro* proliferation assay. siRNA-treated HUVECs were imaged at 24 and 48 h proliferation times after prestaining with crystal violet (*A*). Following lysis, optical density (OD) of the resulting solutions was measured at 560 nm (*B*). □: control siRNA-, ■: siRNA-treated HUVECs. *C.* and *E.* *in vitro* adhesion assay. 15 min after cells seeding, adherent siRNA-treated cells, stained with crystal violet, were imaged (*C*). After lysis, OD of the resulting solutions was measured at 560 nm (*E*). *D.* and *F.* wound healing assays. Confluent monolayers of siRNA-treated cells were scratched (Time = 0) and imaged over time to track wound reclosure (*D*). The distances covered by the cell fronts were measured over time (*F*).

Fig. 9. Dynamics of VE-cad-GFP at endothelial cell-cell contacts. *A.* Representative examples of pre- and post-photobleached images of VE-Cad-GFP at cell-cell contacts. VE-cad-GFP overexpressing HUVECs transfected with either control or EPLIN siRNA were grown to confluency prior performing FRAP experiments. Arrows point to photobleached spots. *B.* Mean fluorescent recovery curves for control and EPLIN siRNA-treated HUVECs. The curves were generated from 50 independent experiments for control (Left) and EPLIN (Right) siRNA-treated cells.

Fig. 10: Subcellular distributions of EPLIN and vinculin in HUVECs. *A.* HUVECs were stained with pAb anti-EPLIN, mAb anti-vinculin, Alexa488-labelled goat-anti-rabbit and Alexa568-labelled goat-anti-mouse antibodies and Hoechst. Bar: 20 μ m. Arrows and arrowheads pointed out mature and immature cell-cell junctions, respectively. *B.* Immunofluorescence analysis of EPLIN and vinculin distributions in siRNA-treated HUVECs. 24 h after transfection with control (Ctrl) or EPLIN siRNA, HUVECs were stained for EPLIN, vinculin and nuclei (Hoechst) as described in Panel A. Scale bar: 20 μ m. Boxed regions are magnified in the side pannels. Scale bar: 10 μ m.

Fig 11: Effect of blebbistatin treatment on the subcellular localization of α -catenin, EPLIN and vinculin revealed by confocal microscopy analysis. HUVECs treated with 0, 5, 10 and 50 μ M blebbistatin were fixed before double labelling for α -catenin and EPLIN (Panel A) and for α -catenin and vinculin (Panel B).

Fig 12: Effects of blebbistatin on junctional recruitment of vinculin and EPLIN. Differences in the junctional levels of EPLIN and vinculin were quantified after pretreatment with 0, 5, 10 μ M blebbistatin and double-stained for EPLIN and α -catenin and for vinculin and α -catenin. Fluorescence intensities were measured along white lines perpendicularly drawn to cell-cell junctions as illustrating in Panel A. After background subtraction, fluorescence intensity profiles were generated and superimposed (A.U: arbitrary unit) (*B*). The maximal intensity of the fluorescence (*I* max) was used as a measure of junctional protein level. For normalization, EPLIN and vinculin *I* max were divided by the corresponding α -

catenin I max to generate EPLIN/ α -catenin (C) and vinculin/ α -catenin (D) ratios. The mean values for the ratios were obtained from 20 measures for each condition. The data show that junctional level of vinculin decreased as blebbistatin concentration increased. By contrast, the junctional level of EPLIN remained roughly constant.

Fig 13: Localization of EPLIN and VE-cadherin in pseudo-vascular structures elaborated in matrigel matrix. Pseudo-vascular tubules were formed using untreated HUVECs (Panel A) or siRNA-treated HUVECs (Panel B). At 24h post cell seeding time, cells were labelled for EPLIN, VE-cadherin and nuclei as performed in **Fig7B**.

Fig 14: Localization of EPLIN and α -catenin in pseudo-vascular structures elaborated in matrigel matrix. Pseudo-vascular tubules were formed using untreated HUVECs (Panel A) or siRNA-treated HUVECs (Panel B). At 24h post cell seeding time, cells were labelled for EPLIN and α -catenin as performed in **Fig7A**.

Fig. 15. Effect of EPLIN depletion on *in vitro* tubule formation assay. *A.* Phase contrast videomicroscopy images comparing the vascular network formation process for HUVECs pretreated with control (siCtrl) or EPLIN (siEPLIN) siRNAs. 24 hours after siRNA transfection, HUVECs were plated onto matrigel layers for 2 hours before time lapse microscopy of the temporal evolution of pre-capillary structures. Post-seeding time is mentioned on each image. Arrows point out capillary network breakage. Note that some endothelial cells aggregated into bunches (\blacktriangle). *B.* Quantification of the vascular network full length. Phase contrast videomicroscopy images such as those presented in panel A were treated using ImageJ software to calculate the full length of capillary network. Mean values reported in this panel were calculated from three different observation fields. Control (\blacksquare) and EPLIN (\square) siRNA-treated HUVECs.* indicates statistical difference with p value < 0.05. *C.* Quantification of the average number of breakage events per image over time. Breakage events were counted at 26 h post cell seeding time. Mean values reported in this panel were calculated from three different observation fields.

Fig 16: EPLIN acts as a tension transducer at the basis of the conformational modification in α -catenin [adapted from (9)]. *A.* In the absence of EPLIN, actomyosin contractility is not transmitted to α -catenin (α -cat). Consequently, α -cat keeps its folded conformation and cannot interact with vinculin as shown in **Fig 10B**. *B.* In the presence of blebbistatin, actomyosin contractility is blocked and α -cat is maintained under a folded conformation preventing vinculin recruitment as illustrated in **Fig 11B**. *C.* When myosin-II exerts its contractile activity, α -cat adopts a stretched conformation allowing vinculin recruitment and thus F-actin anchoring to cell-cell junctions.

TABLE LEGENDS

Table I: Primers used for amplifying PCR products

Transcript	Sense	Antisense	Size
VE-	5'-CGCCTCTGTCATGTACCAAA-3'	5'-GTCTTCAGGCACGACAAATG-3'	252
EPLIN	5'-GGAGCAAAAAGGAGAATGTGC-3'	5'-AATAGGAGCAACGGAAGCAG-3'	359
HPRT	5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3'	5'-AAGCAGATGGCCACAGAACT-3'	427

Table II: PCR parameters

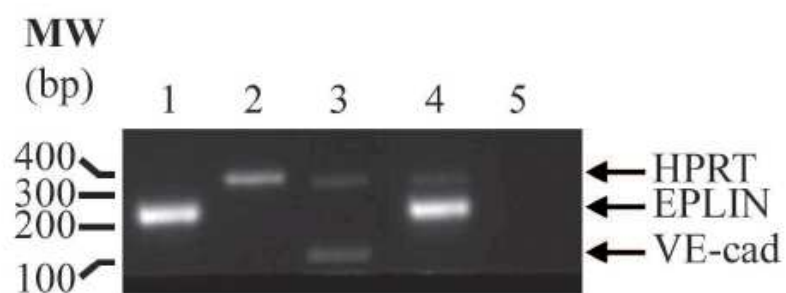
Step	Conditions	Cycle
Initial denaturation	3 min at	1 cycle
Denaturation	30 s at 94°C	30 cycles
Annealing	30 s at 55°C	
Elongation	30 s at 72°C	
Final elongation	10 min at	1 cycle

Table III: Conditions of culture of the different cell lines

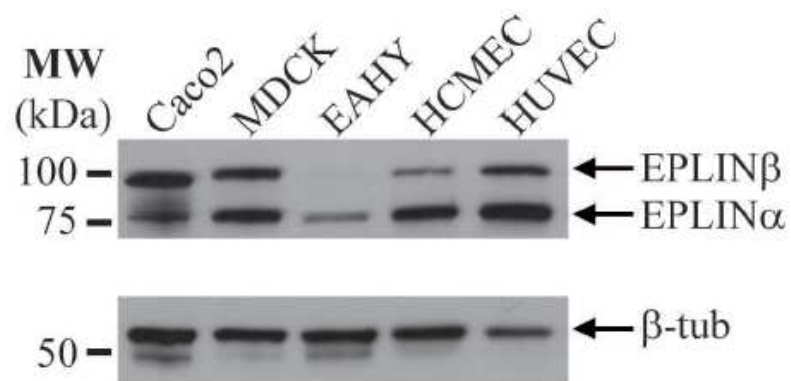
Cell type	Medium
Caco2	α MEM, 20% FCS, 1% ATAM
MDCK	DMEM, 10% FCS, 1% ATAM, 1% non essential amino acids
EAHY	DMEM, 10% FCS, 1% ATAM
HCMEC	EBM-2 supplemented with ¼ of EGM-2 SingleQuots
HUVEC	M199, 20% FCS, 2% LSGS, 1% ATAM
	EBM-2 supplemented with EGM-2 SingleQuots

Fig1

A



B



C

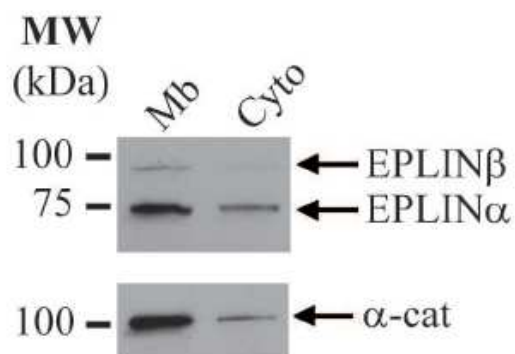


Fig2

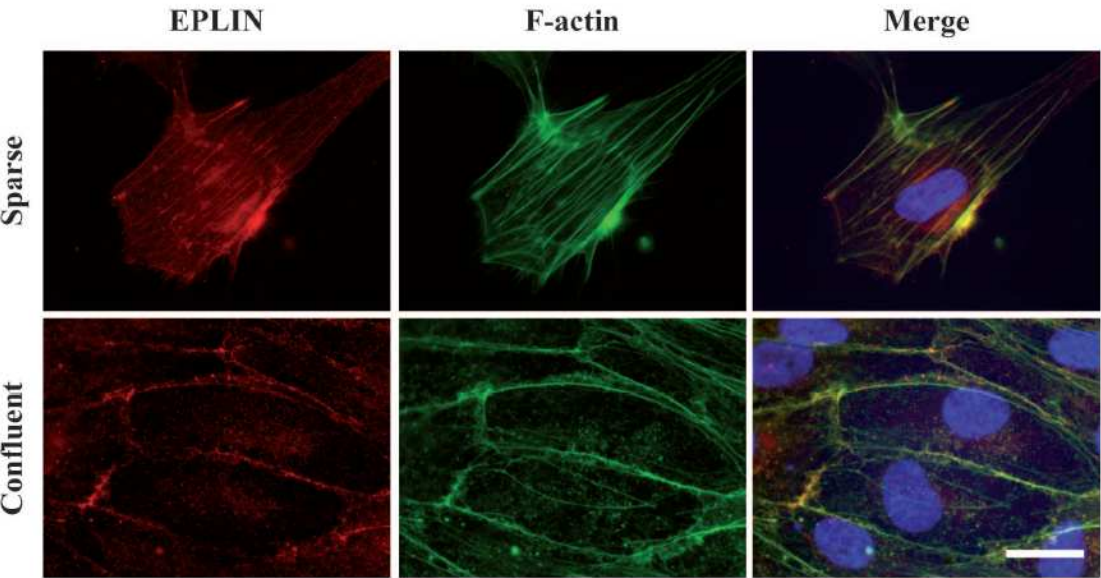


Fig3

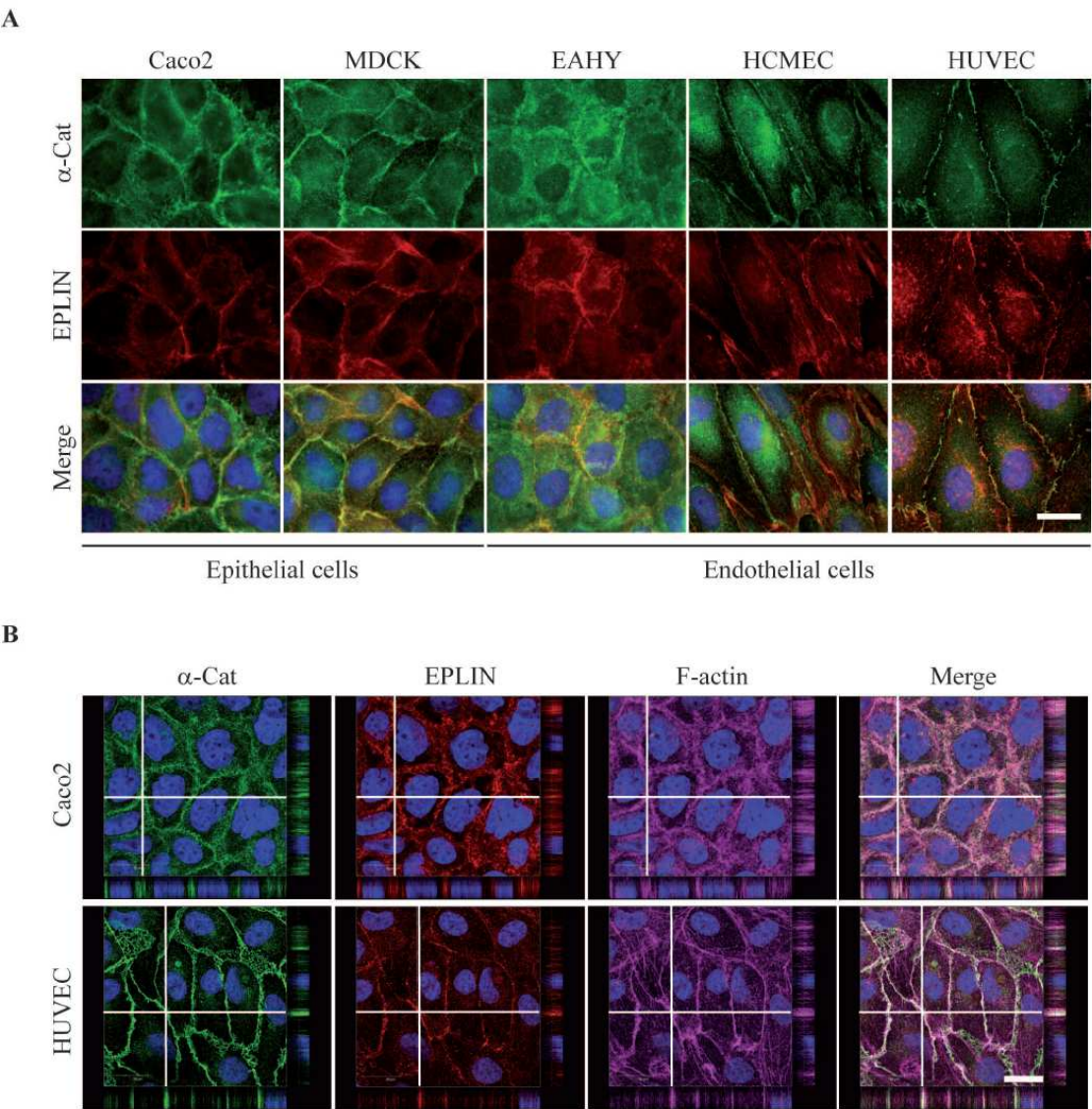


Fig4

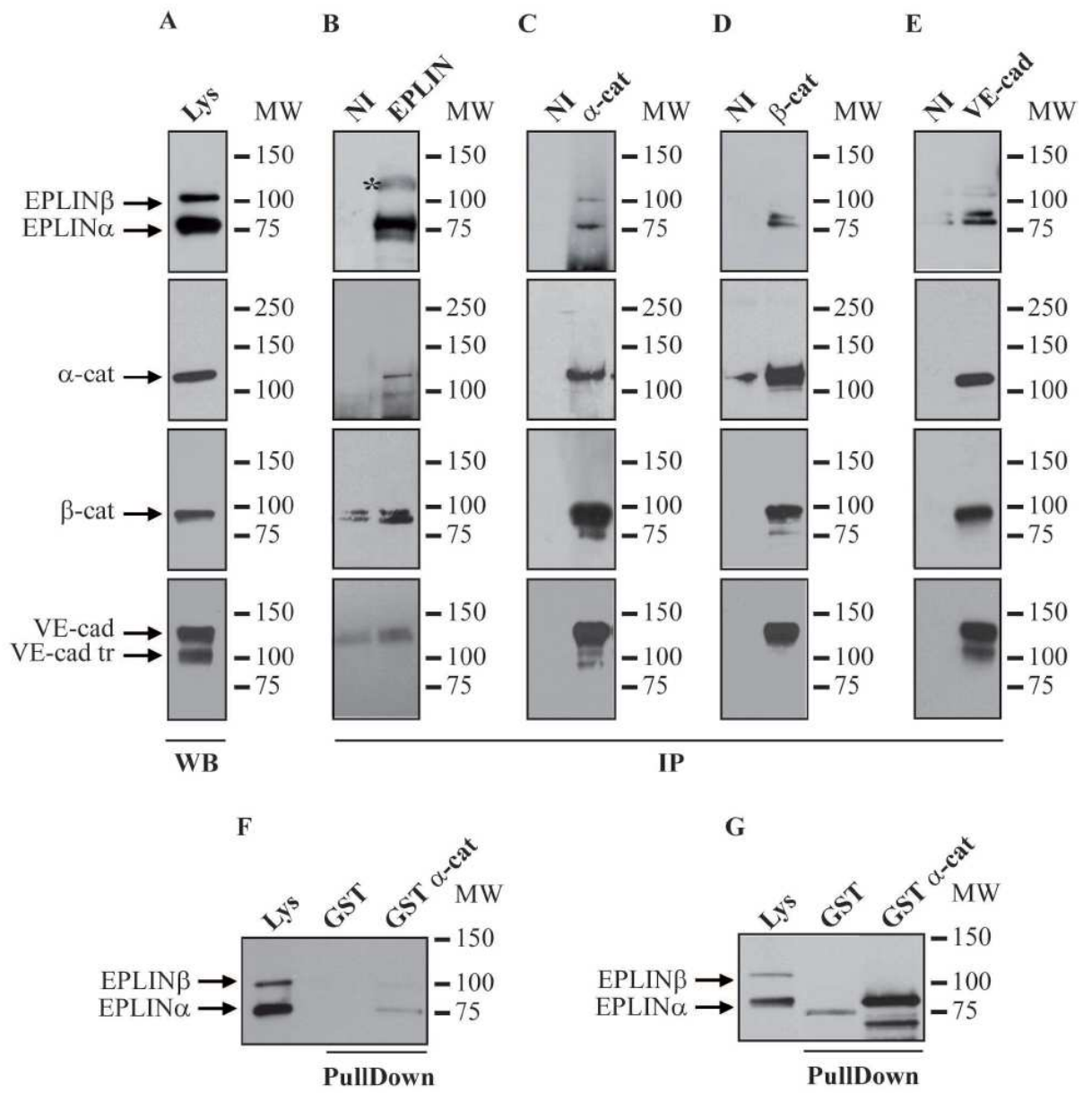


Fig5

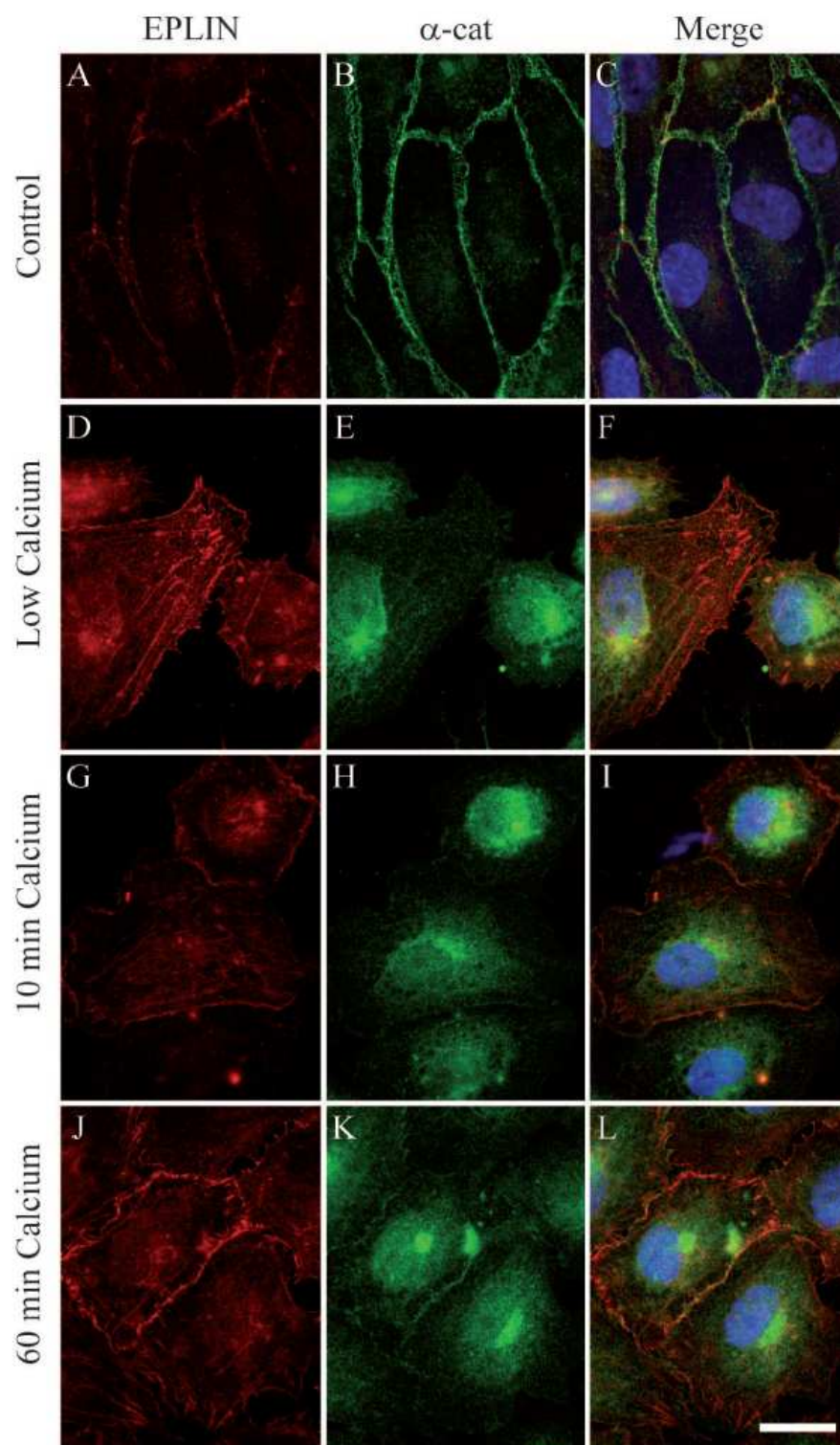


Fig6

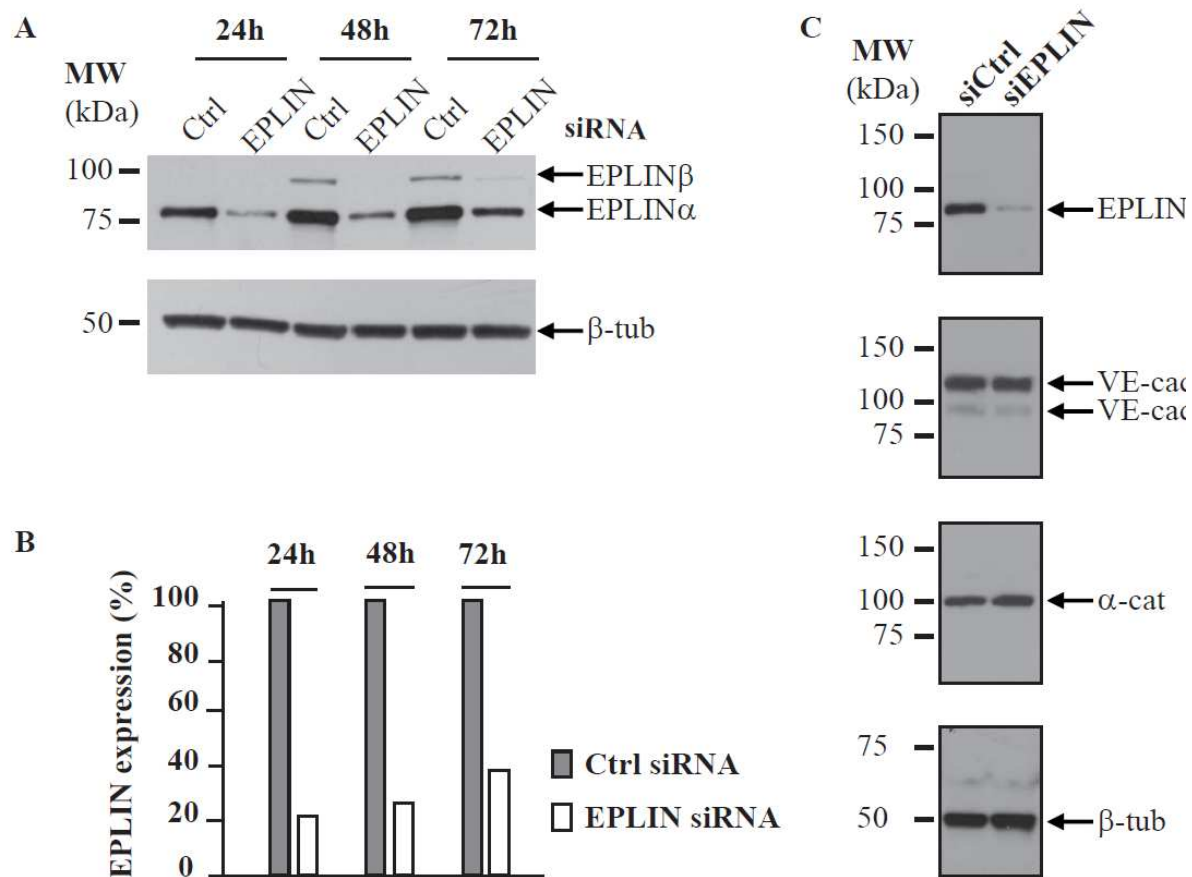


Fig7

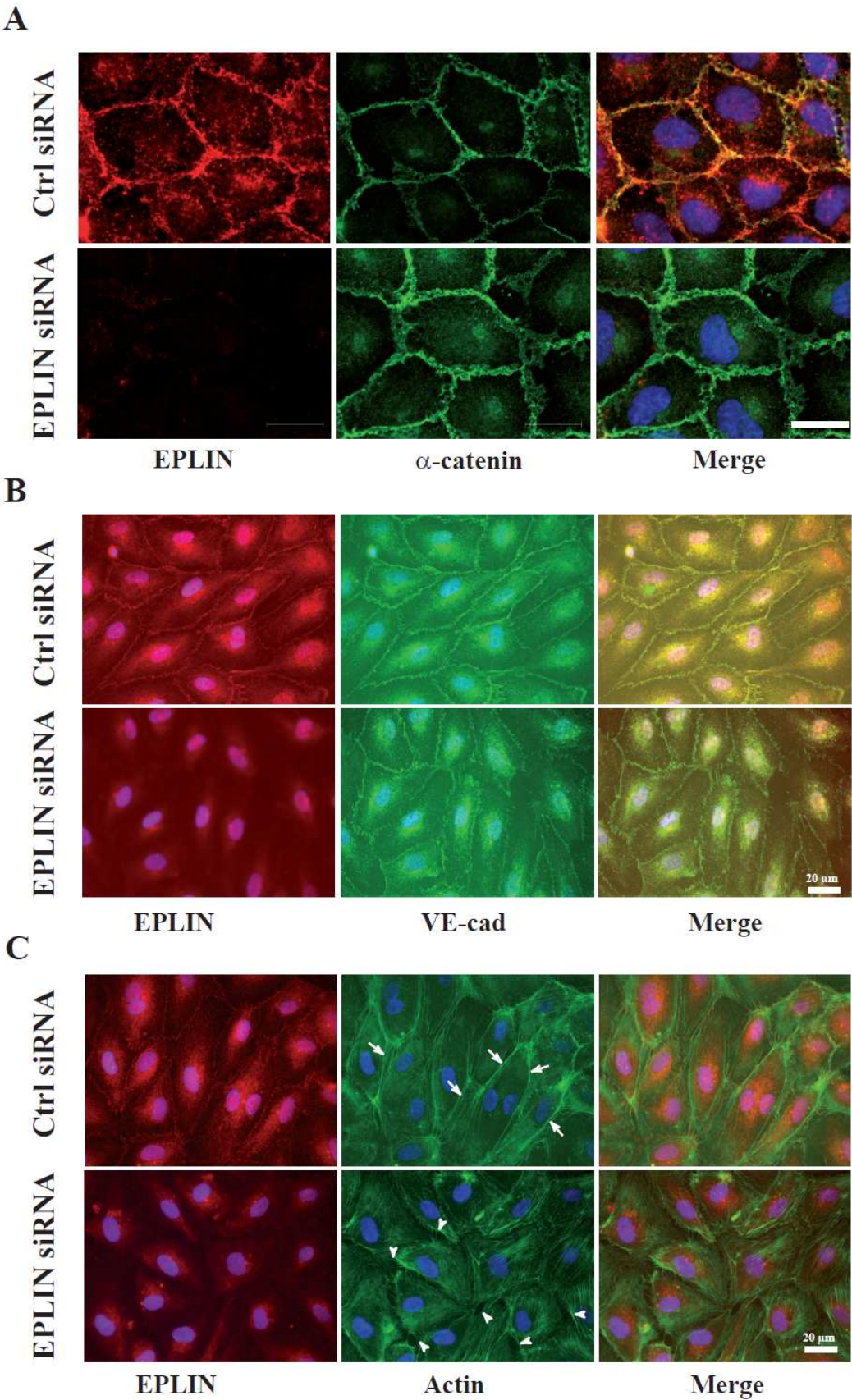


Fig8

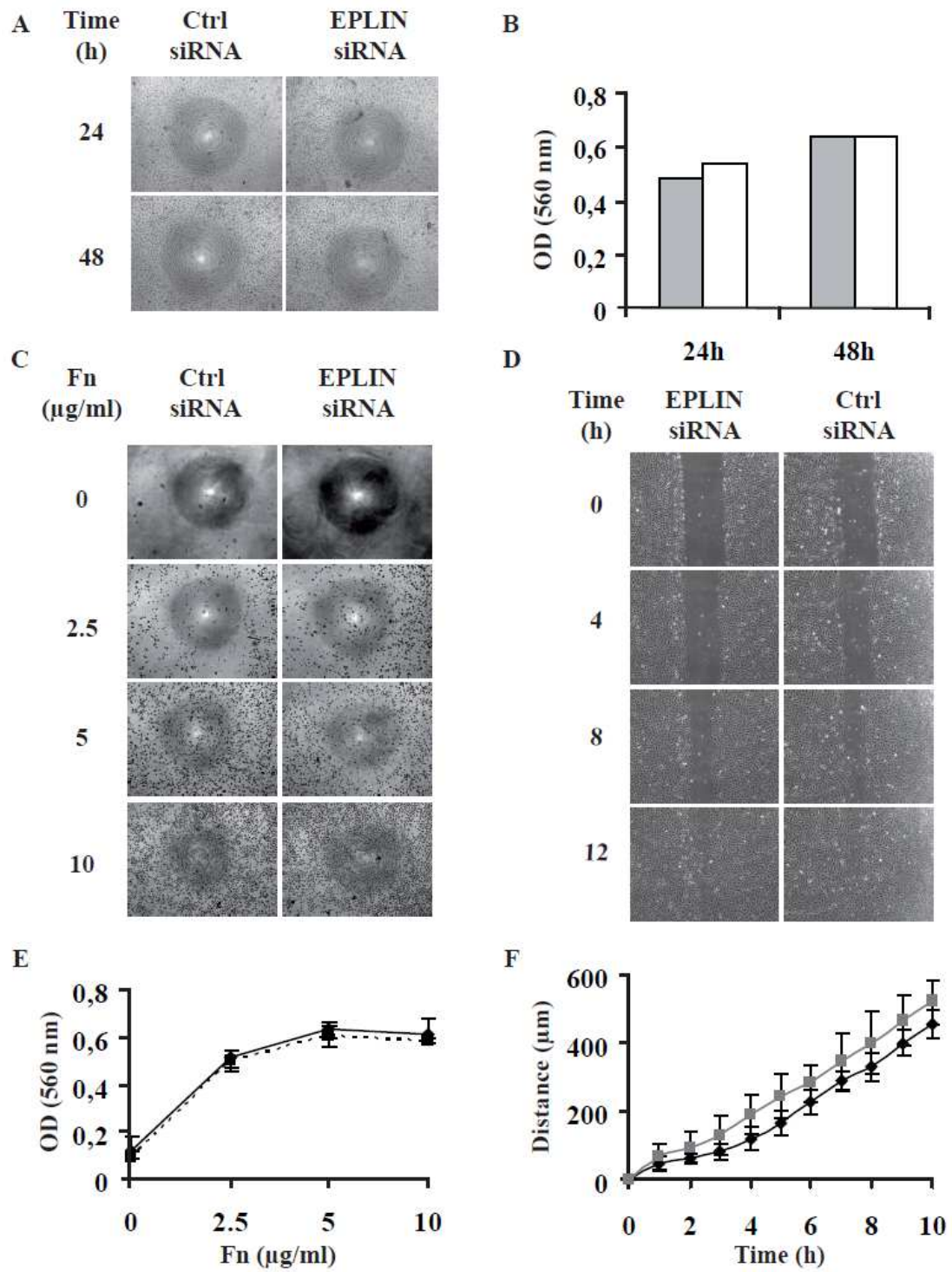


Fig9

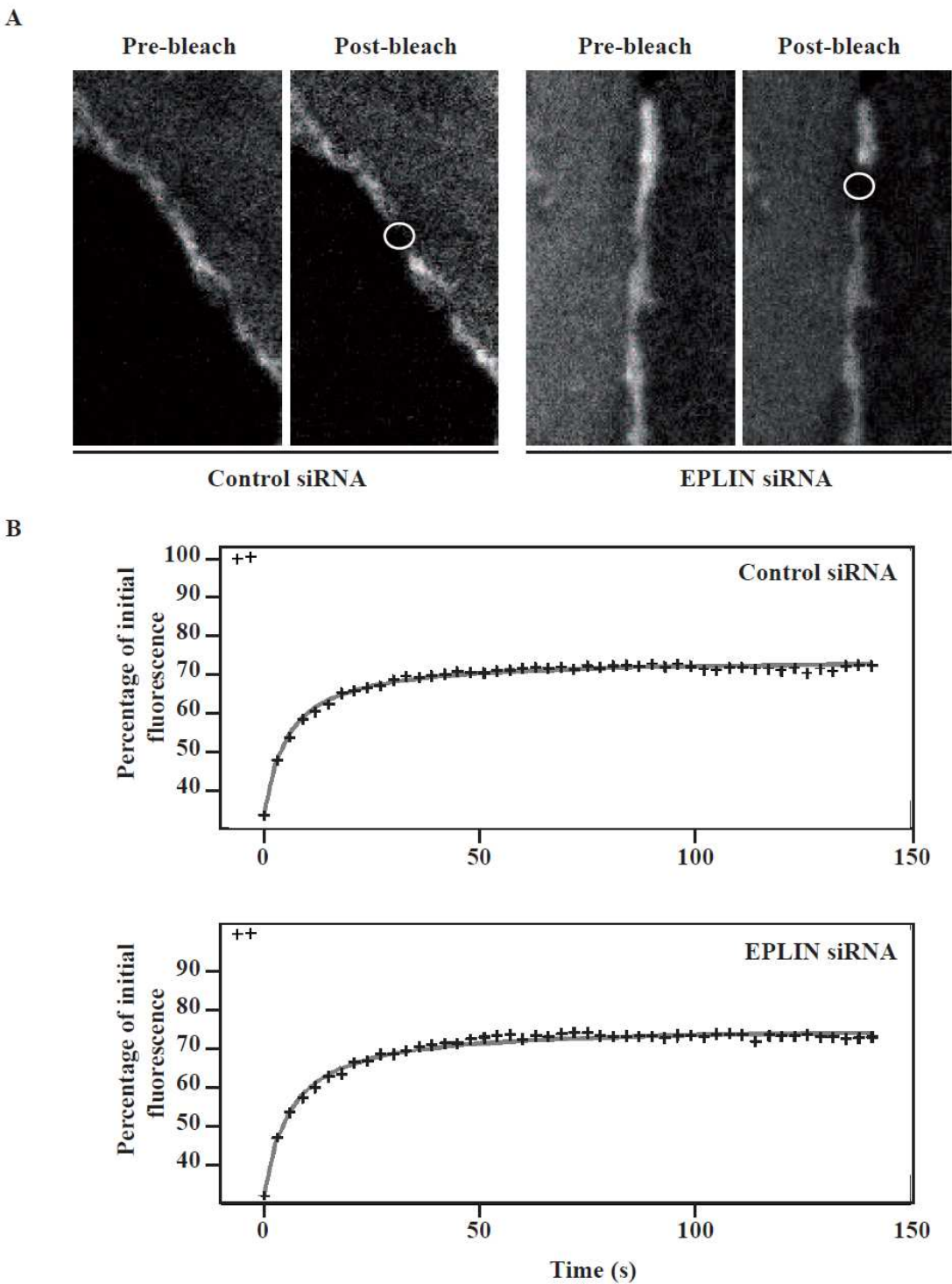
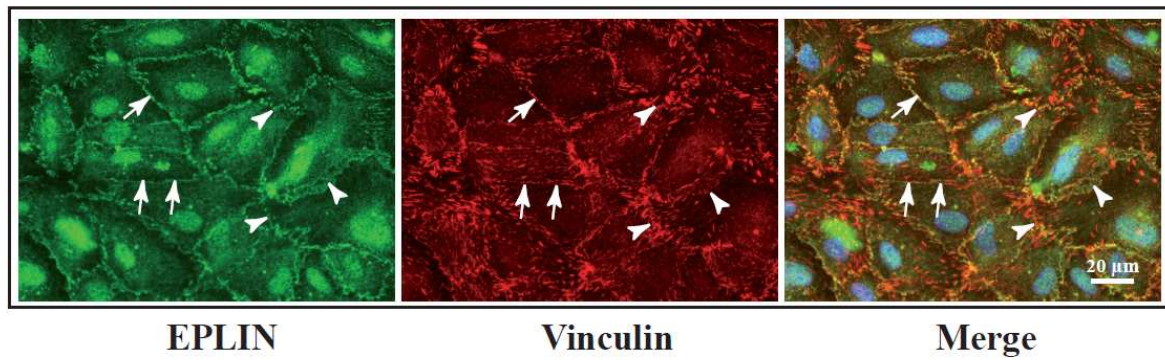


Fig 10

A



B

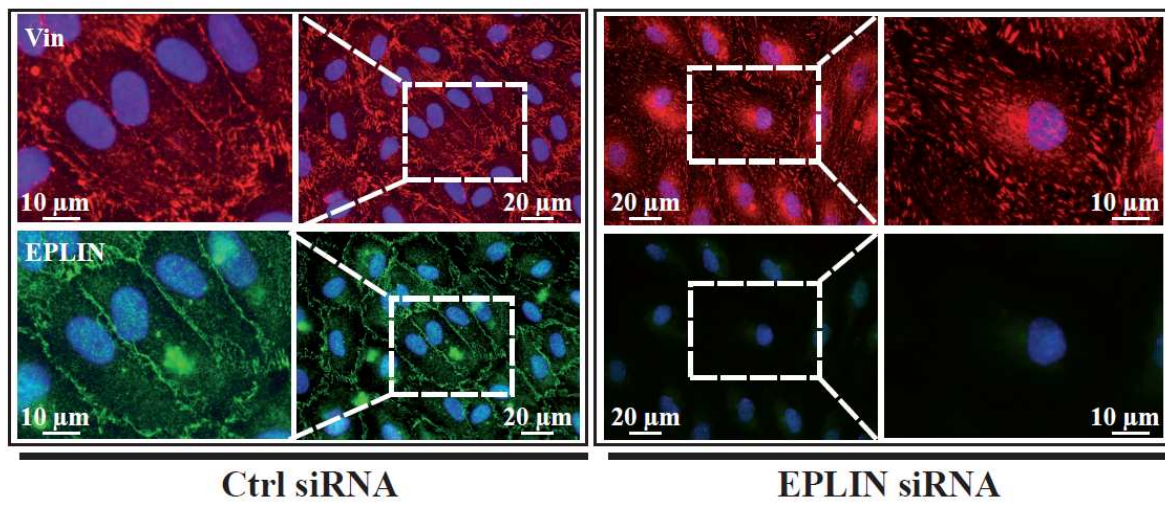


Fig 11

A

Blebb

0 μ M

5 μ M

10 μ M

50 μ M

α -catenin

EPLIN

Merge

20 μ m

20 μ m

20 μ m

20 μ m

B

α -catenin

Vinculin

Merge

20 μ m

20 μ m

20 μ m

20 μ m

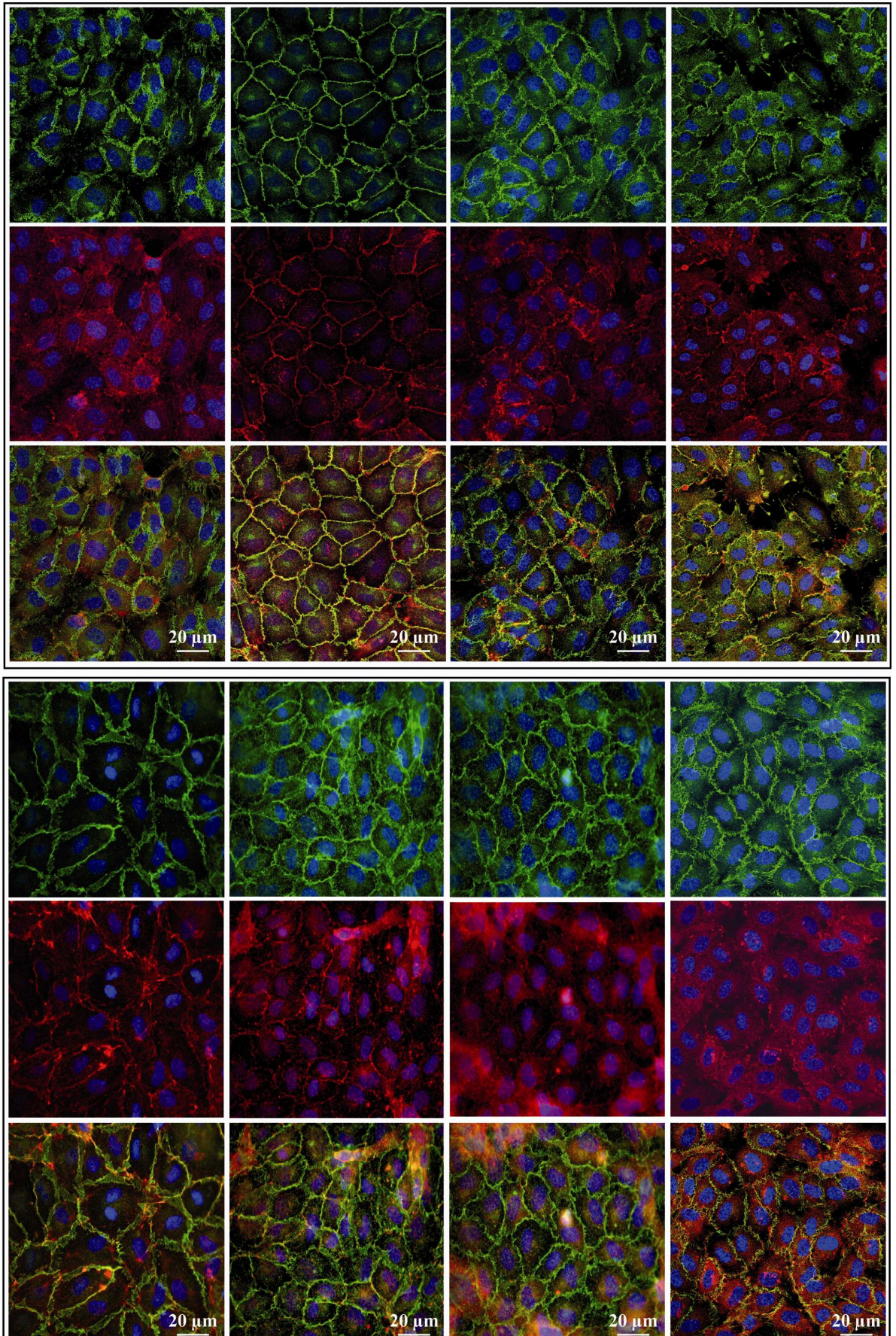


Fig 12

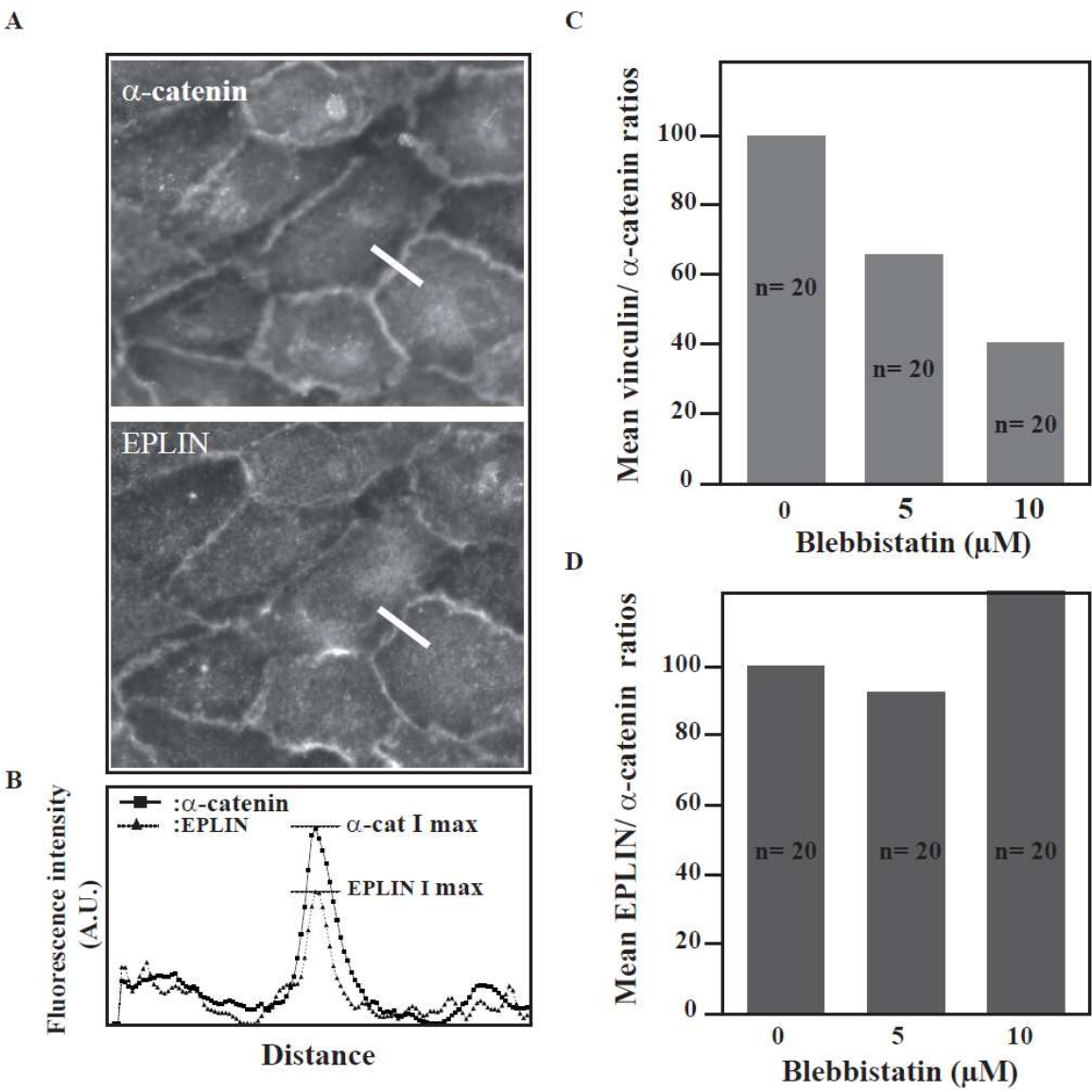
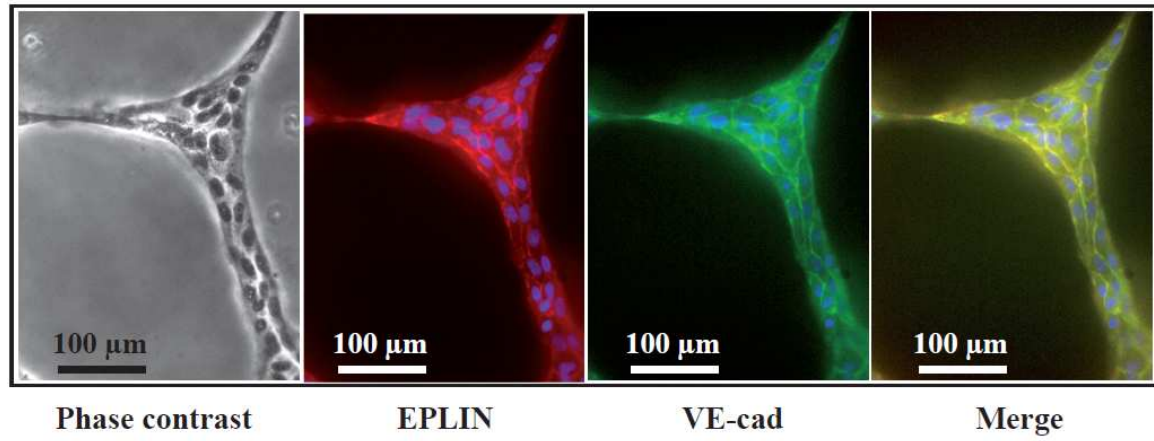


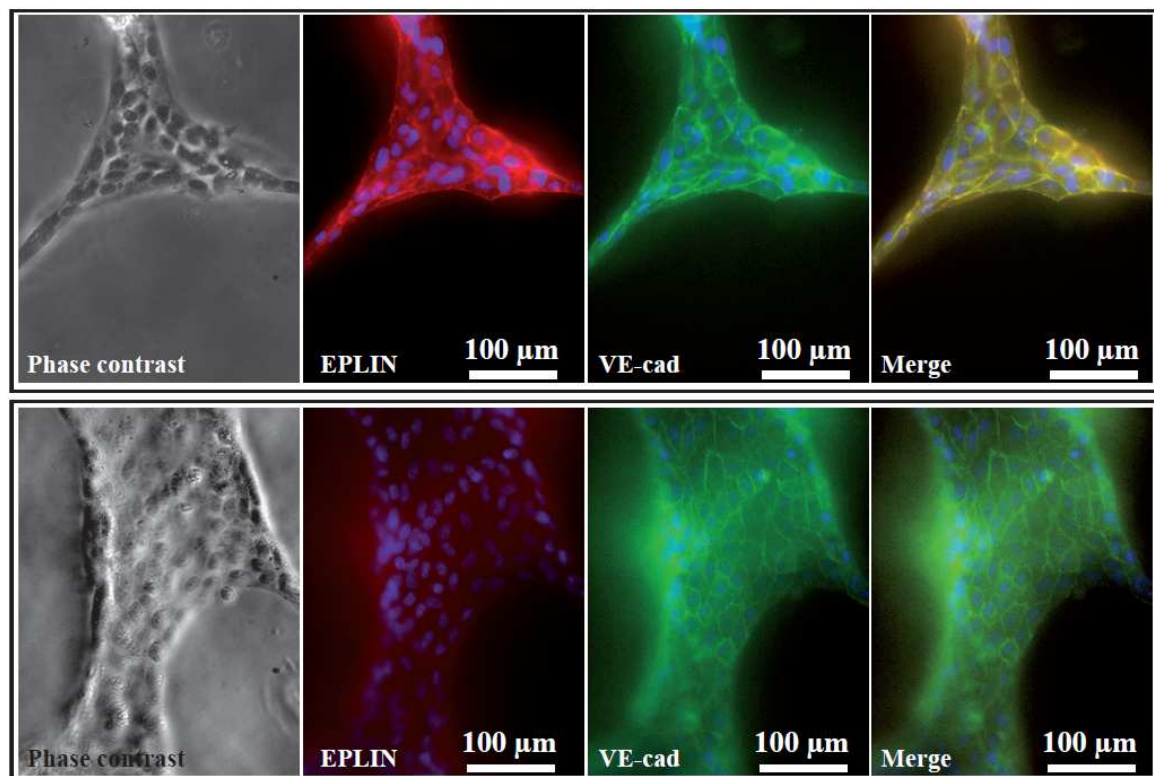
Fig 13

A



B

Ctrl siRNA



EPLIN siRNA

Fig 14

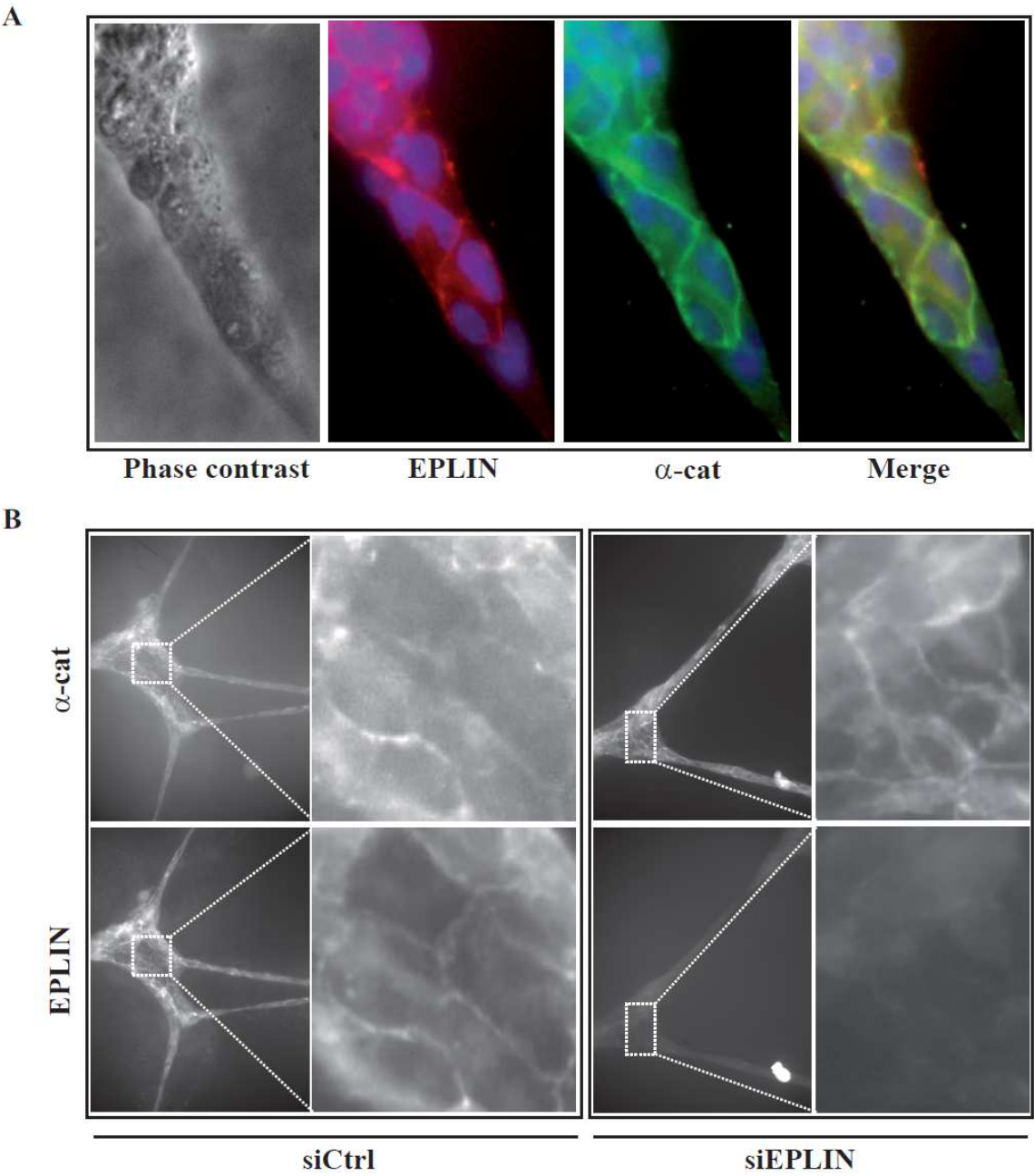
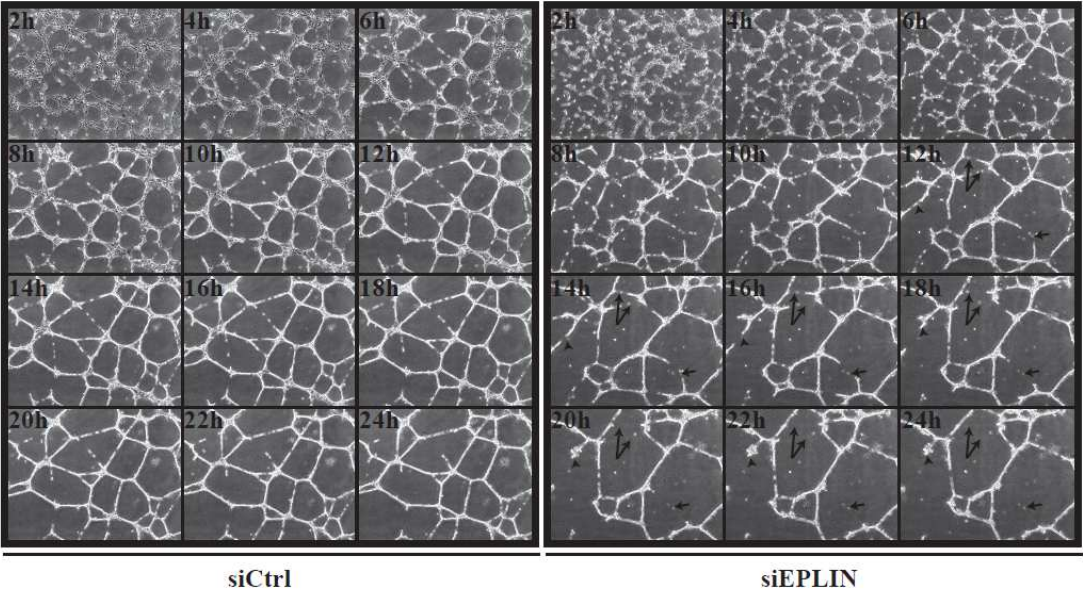
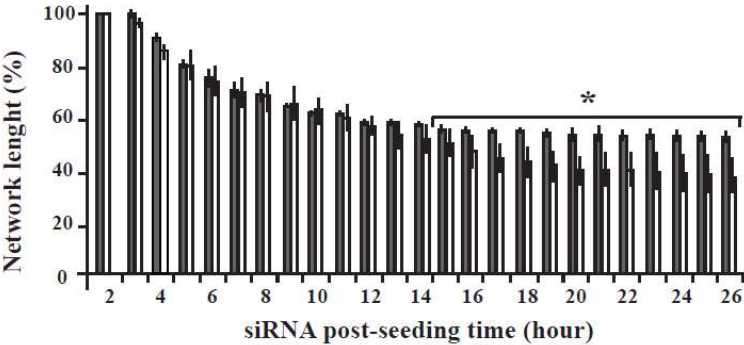


Fig15

A



B



C

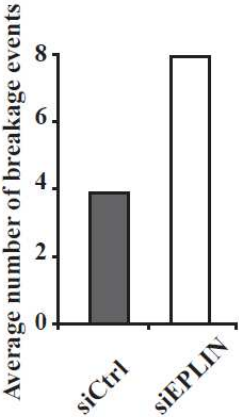
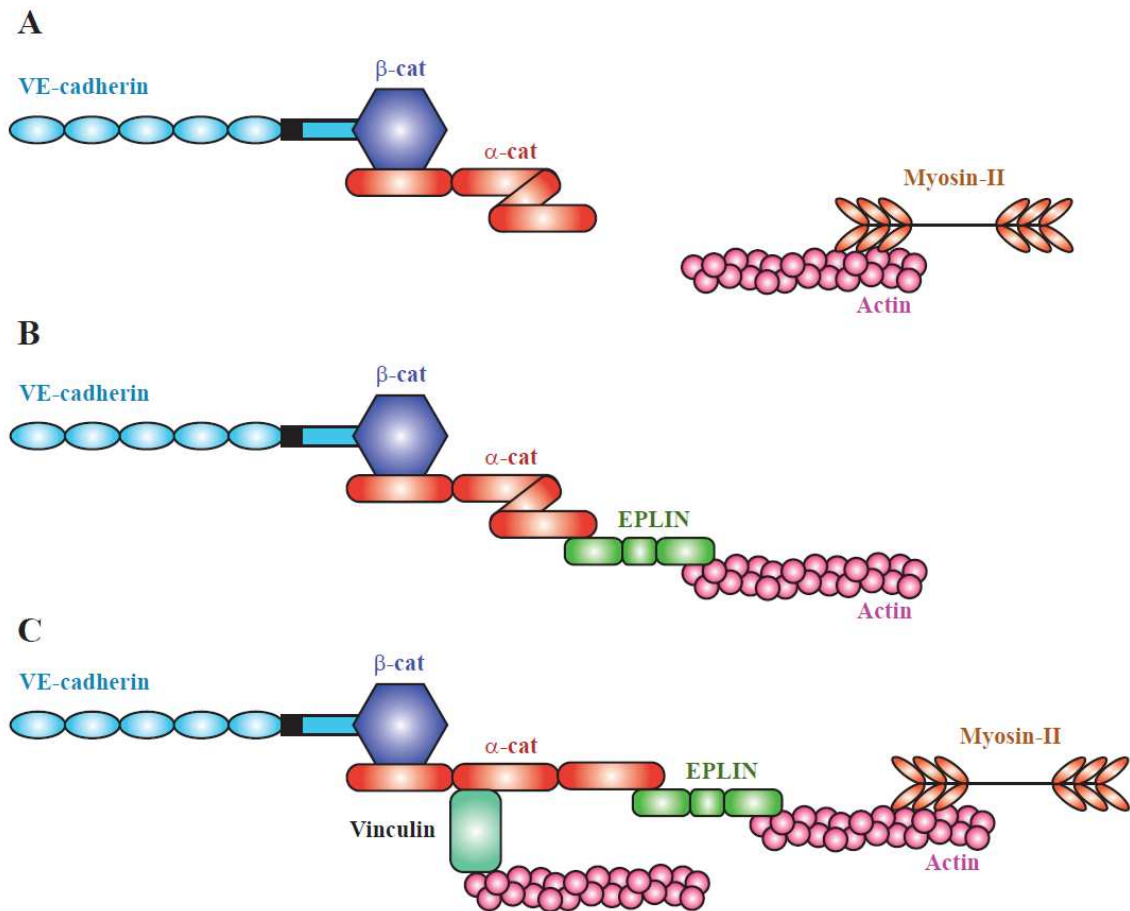


Fig16



Adapted from Yonemura and al., Nature Cell Biology, 2010

C. Discussion

Comme il a été mentionné dans le contexte de l'étude, EPLIN est une protéine peu connue et les données de la littérature à son sujet sont peu abondantes. A ce jour, seules 22 publications sont référencées sous le nom de cette protéine. Etudier cette protéine présente l'avantage d'initier de nouvelles découvertes, néanmoins la réalisation de cette étude a été semée d'embûches dues au manque d'outils adéquats en particulier d'anticorps commerciaux spécifiques.

Rappelons qu'EPLIN est une protéine dont l'expression est fortement diminuée dans des lignées cellulaires de cancer épithéliaux mais également *in vivo* dans des cancers de type épithéliaux (**Jiang et al., 2008; Maul and Chang, 1999; Zhang et al., 2011**). Son caractère décrit comme exclusivement épithélial lui a d'ailleurs valu son nom : Epithelial Protein Lost In Neoplasm. Dès lors, il semble discutable de s'intéresser à la présence et au rôle d'EPLIN dans l'endothélium. Et ce d'autant plus que le peu de résultats publiés évoquaient de manière unanime une expression faible voire inexistante d'EPLIN dans des modèles de cellules endothéliales d'origine veineuse [HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell), HECV (Human endothelial cord vein cells)] ou artérielle (cellules endothéliales aortiques) (**Jiang et al., 2008; Maul and Chang, 1999; Sanders et al., 2010**). D'un autre côté, il semblait légitime de s'interroger sur la présence d'EPLIN dans l'endothélium puisque, d'une part, l'endothélium est par définition un type d'épithélium particulier et d'autre part, EPLIN s'exprime dans de nombreux tissus très vascularisés et donc riches en cellules endothéliales : cœur, poumon, foie, cerveau, placenta...(Maul and Chang, 1999). Les résultats expérimentaux de notre étude montrent, sans ambiguïté possible, qu'EPLIN s'exprime tant au niveau ARN (dans les HUVECS) qu'au niveau protéique dans plusieurs types de cellules endothéliales de la circulation veineuse ou microvasculaire (HUVEC, EAhy-926, HCMEC).

Par ailleurs, sa localisation subcellulaire en immunofluorescence au niveau des fibres de stress dans les HUVECs éparses ou aux jonctions intercellulaires dans les cellules confluentes concordent avec les données publiées sur les cellules épithéliales (**Abe and Takeichi, 2008; Han et al., 2007; Song et al., 2002**). Au-delà de cette colocalisation en imagerie, nous avons également montré par des expériences de co-immunoprécipitation et de GST-Pull Down qu'EPLIN s'intègre dans l'architecture du complexe à base de VE-cadhérine en s'associant avec l' α -caténine à l'image du complexe à base de E-cadhérine (**Abe and Takeichi, 2008**).

La diminution l'expression d'EPLIN dans les tumeurs et les cellules dérivées de cancers est un fait bien établi. Nous nous sommes donc demandé si la perte de l'expression d'EPLIN ne contribuait pas à ce que les cellules cancéreuses perdent leur capacité à adhérer à la matrice extracellulaire et acquièrent des capacités migratoires et prolifératives. C'est pourquoi, nous avons utilisé une stratégie d'ARN interférence pour mimer la diminution de l'expression d'EPLIN observée dans un contexte tumoral. De manière surprenante, il s'avère que l'extinction d'EPLIN ne modifie pas la capacité des HUVECs à adhérer à la matrice extracellulaire, à migrer pour refermer une blessure ou à proliférer. On aurait, en effet, pu s'attendre à ce que ces caractéristiques soient modifiées en absence d'EPLIN. En effet, la surexpression d'EPLIN diminue à la fois les capacités d'adhérence et de migration des cellules dans des cellules HECV (**Sanders et al., 2010**) et diminue le taux de prolifération et les capacités d'adhérence à la matrice d'une lignée cellulaire issue d'un cancer de la prostate (**Sanders et al., 2011**). Ces résultats contradictoires sont sans doute dus aux différentes stratégies utilisées : nous avons utilisé l'ARN interférence pour diminuer l'expression d'EPLIN alors que l'équipe de Jiang a choisi de forcer l'expression d'EPLIN en transfectant un vecteur codant pour la protéine.

Comme l'extinction d'EPLIN ne modifie pas les principales propriétés des cellules HUVEC, nous avons voulu déterminer quel pouvait être le rôle d'EPLIN dans l'endothélium spécifiquement. Ce qui distingue les cellules endothéliales des cellules épithéliales, c'est leur capacité à s'organiser pour former des structures tubulaires dans des supports de culture en trois dimensions (3D) comme le matrigel (**Arnaoutova et al., 2009**). Nos résultats indiquent une forte altération du réseau pseudo-capillaire formé par les HUVECs en absence d'EPLIN, apparemment dû à des phénomènes de cassures dans les structures tubulaires. De plus, l'absence d'EPLIN provoque également une modification de l'organisation du cytosquelette d'actine qui entrave très probablement le remodelage des jonctions nécessaire aux cellules endothéliales pour former les structures pseudo-vasculaires.

Il apparaît très clairement qu'EPLIN a un rôle important dans l'organisation du cytosquelette d'actine et le remodelage des jonctions adhérentes. Par ailleurs, EPLIN interagit et colocalise avec deux protéines « clé » de la mécanotransduction : l' α -caténine et la vinculine (**le Duc et al., 2010; Lecuit, 2010; Yonemura et al., 2010**). En effet, l' α -caténine existe sous deux conformation, l'une repliée, l'autre étirée, en fonction du niveau de tension environnante. La vinculine est recrutée. Quant à la vinculine, cette dernière est recrutée au niveau de l' α -caténine lorsque les tensions sont suffisantes pour déplier l' α -caténine et démasquer le site d'interaction avec la vinculine. Ainsi, en présence de blebbistatine qui

inhibe la contractilité induite par la Myosine II, la vinculine est délocalisée des jonctions intercellulaires (**Yonemura et al., 2010**). En revanche, cet inhibiteur est sans effet sur la localisation d'EPLIN aux jonctions intercellulaires. Il semble donc que le recrutement d'EPLIN aux jonctions intercellulaires ne soit pas sensible aux tensions environnantes. Il apparaît également qu'il existe une coopération entre EPLIN et vinculine. En effet, la présence d'EPLIN est nécessaire au recrutement de la vinculine au niveau des jonctions interendothéliales. Ces différentes observations nous ont amené à établir qu'EPLIN, en coopérant avec l' α -caténine et la vinculine, est un acteur de la mécano-transduction nécessaire au remodelage des jonctions intercellulaires. Les jonctions intercellulaires privées d'EPLIN, face aux forces générées dans la matrice de matrigel, ne sauraient apporter une réponse adaptée, aboutissant ainsi à la rupture des contacts intercellulaires et à la désorganisation du réseau précapillaire.

II. Etude des forces engagées par l'endothélium

Cette seconde partie des résultats fait référence à un travail mené en étroite collaboration avec Alice Nicolas du Laboratoire des Technologies pour la Microélectronique (LTM, Minatec, Grenoble). Ce projet d'étude des forces engagées par l'endothélium réunit à la fois physiciens, chimistes et biologistes. Abbas Mgharbel et Michel Moussus ont réalisé un long travail de mise au point des substrats avant de pouvoir effectuer les premiers tests. Dans ce paragraphe, j'évoquerai brièvement les technologies qu'ils ont utilisé pour mettre au point les substrats. Pour ma part, la participation à ce travail concernait essentiellement l'ingénierie des cellules et l'imagerie associée. C'est pourquoi, les résultats présentés ci-après se concentrent sur les premiers tests réalisés avec les cellules HUVECs.

A. Description du projet

En association avec le LTM, notre équipe a initié un nouveau projet à l'interface entre physique et biologie. Ce projet s'intéresse aux jonctions intercellulaires de l'endothélium d'un point de vue mécanique. En effet, observé en vidéomicroscopie, l'endothélium reconstitué à partir de cellules issues de la veine ombilicale humaine a un comportement très dynamique. Les cellules se meuvent les unes par rapport aux autres sans que l'intégrité du tissu ne soit modifiée. Par ailleurs en cas de blessure infligée à la monocouche endothéliale, les cellules à la périphérie de la plaie se mettent à migrer pour recoloniser la région lésée et restaurer l'intégrité de l'endothélium. C'est le remodelage dynamique des jonctions intercellulaires qui autorise ces transformations physiques. Plus particulièrement, ce sont les jonctions adhérentes et notamment la famille des cadhérines ainsi que leur connexion au cytosquelette d'actine qui permettent un remodelage actif du tissu.

L'objectif de ce travail est plus particulièrement d'évaluer la contribution des efforts mécaniques développées par les cellules dans les phénomènes de réarrangement et de réparation tissulaire. Dans cette étude, le modèle biologique est l'endothélium reconstitué à partir de cellules issues de la veine ombilicale humaine (HUVEC). Deux approches différentes sont utilisées pour aborder et évaluer les forces engagées par les cellules endothéliales. La première utilise un substrat déformable de polyacrylamide possédant des motifs de rigidité contrôlée. La seconde approche emploie un substrat de PDMS microstructuré avec des micropiliers. Ainsi, ces différents substrats vont nous permettre de mettre en corrélation les

forces développées par les cellules avec la dynamique des jonctions intercellulaires au cours de leur maturation ou de la réparation tissulaire.

B. Contexte scientifique et technique

1. Données bibliographiques

a. Lien entre adhérences cellule/matrice et adhérences intercellulaires

Les adhérences intercellulaires et les adhérences cellules/matrice sont des structures bien différenciées, les unes à base de cadhérines, les autres à base d'intégrines, dont le comportement est bien décrit par la littérature. Depuis déjà une dizaine d'années, plusieurs publications mentionnaient l'existence d'un dialogue entre intégrines et cadhérines (**de Rooij et al., 2005; Huttenlocher et al., 1998; Marsden and DeSimone, 2003; Yano et al., 2004**). Récemment, des études de mesure de forces se sont attachées à montrer qu'il existe une étroite relation de dépendance entre les structures d'adhérence intercellulaires et les structures d'adhérence cellule matrice. Des travaux réalisés sur des cellules MDCK mettant en jeu la E-cadhérine aux contacts intercellulaires ont montré que lorsque les cellules s'engagent dans des interactions intercellulaires, les forces transmises à la matrice diminuent. Ces travaux ont été réalisés sur des gels de polyacrylamide dans lesquels des billes fluorescentes ont été insérées afin de quantifier les forces transmises par les cellules. Sur la Figure 35, on constate très clairement que, contrairement à une cellule isolée qui applique des forces sur la matrice en des points localisés à sa périphérie membranaire (**Figure 35 A i et ii**), deux cellules en contact n'exercent plus de force sur la matrice au niveau des contacts intercellulaires (**Figure 35 A iii et iv**) (**Maruthamuthu et al., 2011**).

Par ailleurs cette interdépendance entre adhérence cellule/cellule et adhérence cellule/matrice a également été montré avec la méthode des micropipettes (**Figure 35 B i**). Les expériences indiquent que la force nécessaire pour séparer un doublet de cellules est beaucoup plus importante quand les cellules du doublet ont engagé des interactions avec un composant de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la vitronectine via les intégrines que lorsqu'il n'y a pas d'interaction cellule/matrice (**Figure 35 B ii**) (**Martinez-Rico et al., 2010**). En résumé, l'engagement des intégrines d'une cellule dans l'adhérence à la matrice renforce l'adhérence intercellulaire de cette même cellule.

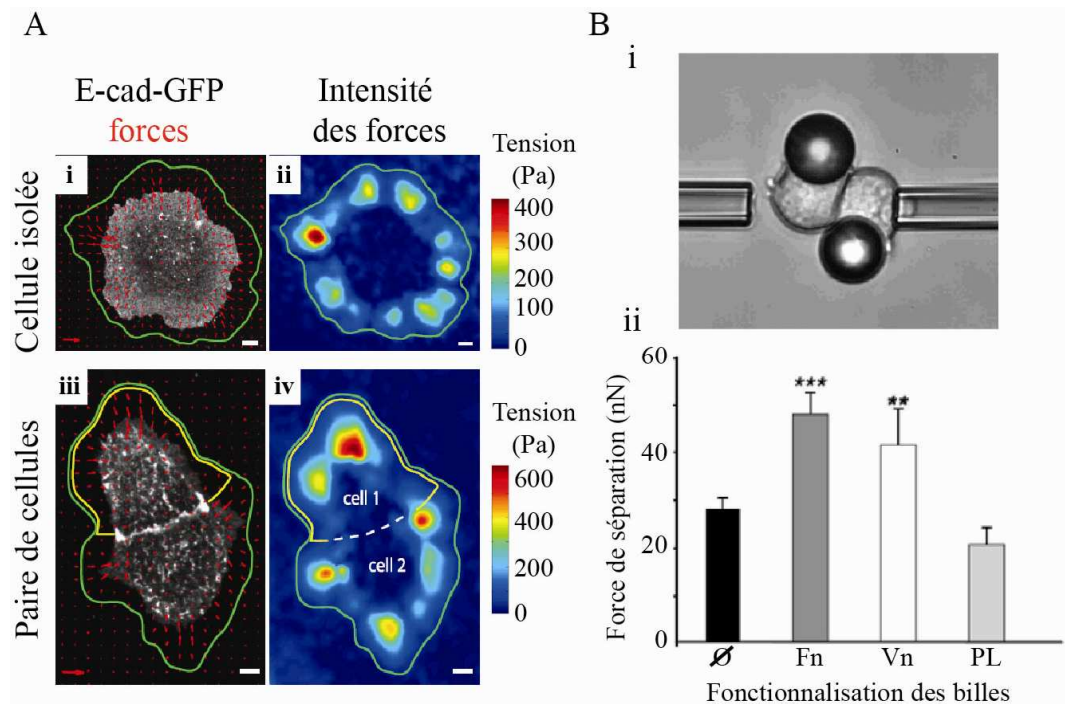


Figure 35 : Lien entre adhérence cellule/matrice et adhérence intercellulaire

(A) Comparaison des forces exercées par une cellule isolée et par une paire de cellules. Superposition du marquage E-cadhérine-GFP dans des cellules MDCK avec les champs de forces (rouge) (i et iii). Représentation de l'intensité des forces exercées par les cellules (ii et iv). D'après (**Maruthamuthu et al., 2011**). (B) Méthode des micropipettes pour mesurer les forces de séparation. Image d'illustration (i). Force de séparation moyenne mesurée pour séparer une paire de cellules exprimant la E-cadhérine seules ou ayant adhéré à une bille de 15 μm recouverte de fibronectine (Fn), de vitronectine (Vn), de polylysine (PL) (ii). D'après (**Martinez-Rico et al., 2010**).

b. Technologies de mesure des forces intercellulaires

A l'heure actuelle, plusieurs méthodes physiques ont été utilisées pour la quantification des forces d'adhérence intercellulaire. L'une d'entre elles, appelée méthode des micropipettes, consiste à manipuler des cellules individuelles en suspension par des micropipettes pour former des doublets de cellules adhérents. Deux cellules maintenues au bout de micropipettes sont mises en contact l'une de l'autre (**Figure 36**). Le paramètre mesuré par cette technique est la force de séparation ; c'est-à-dire la force nécessaire qu'il faut appliquer pour séparer les deux cellules en contact. Après quelques secondes de contact, il est possible de mesurer une force de séparation de quelques nanoNewtons (nN). Cette force de séparation augmente de manière linéaire avec le temps de contact jusqu'à atteindre un plateau après une heure de contact (**Dufour et al., 2005**). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir maîtriser le temps de contact entre les cellules. En revanche, le paramètre mesuré

n'est pas à proprement parler une mesure de la force d'adhérence intercellulaire mais est simplement un indicateur de cette force.

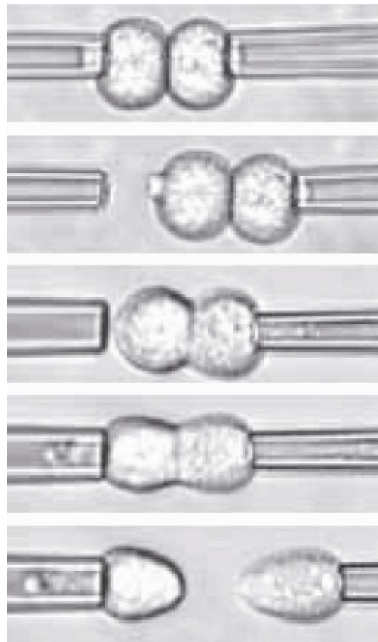


Figure 36 : Méthode de mesure de la force de séparation.

Formation du doublet adhésif entre deux cellules exprimant de la E-cadhérine. Le doublet de cellules est maintenu par une forte aspiration dans la pipette de droite. L'augmentation de l'aspiration dans la pipette de gauche ainsi que l'écartement des pipettes aboutissent à la séparation du doublet. La force de séparation (nN) est calculée à partir du rayon interne de la pipette et de l'aspiration appliquée à gauche au moment de la séparation du doublet. D'après (Dufour et al., 2005).

Une autre approche utilisée est la fonctionnalisation de la pointe d'un microscope à force atomique (AFM). Brièvement, le microscope à force atomique est équipé d'une pointe très fine en silicium au bout d'un levier contrôlé par un piézo. Une équipe a utilisé ce type de montage pour étudier les forces intercellulaires entre une cellule de mélanome et une monocouche de cellules endothéliales (Puech et al., 2006). Ainsi, la pointe AFM est fonctionnalisée avec une cellule de mélanome (Figure 37 A) qui est ensuite mise à adhérer sur un tapis cellulaire d'HUVECs. Sur la Figure 37, on peut voir le comportement viscoélastique classique d'une cellule en cours d'adhérence mesurée par AFM. Au moment du contact, les cellules commencent par se déformer élastiquement (pas d'effet mémoire, la cellule peut reprendre sa forme initiale) puis, lorsque la position en z est constante, les cellules se relâchent comme un matériau viscoélastique (Figure 37 C). Ensuite, en appliquant une vitesse constante pour retirer le levier, la cellule accrochée à celui-ci est séparée de la monocouche (Figure 37 B). L'avantage de cette méthode est de pouvoir contrôler de nombreux paramètres : la force et le temps de contact, la vitesse d'accrochage et de séparation

des cellules. De plus, cette méthode offre la possibilité de travailler dans des conditions physiologiques.

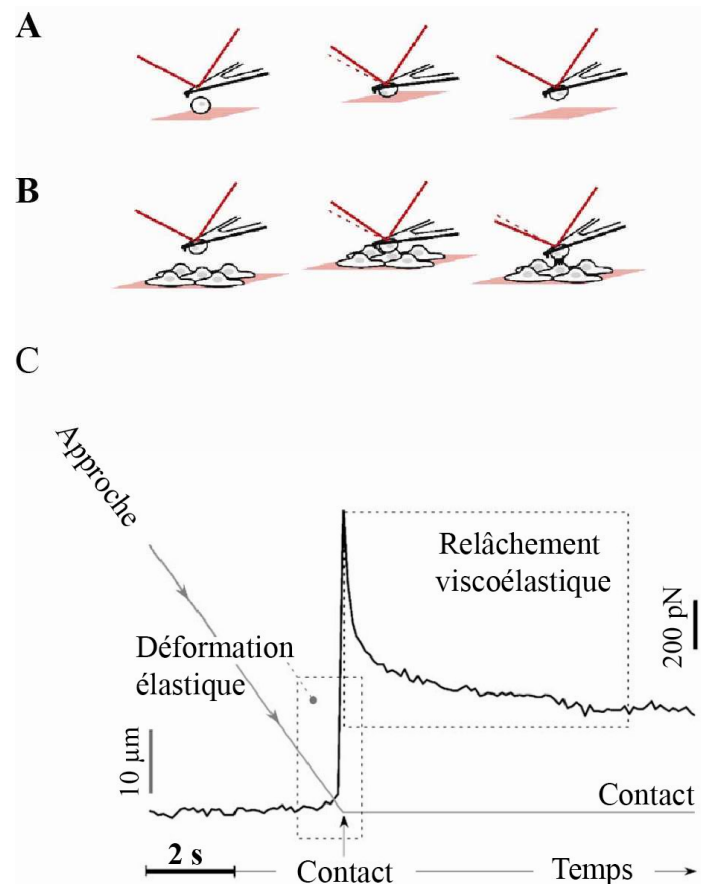


Figure 37 : Mesure des forces intercellulaires par AFM

(A) Représentation schématique de la capture d'une cellule « sonde » sur le levier de l'AFM (B) Essai de séparation d'une cellule de mélanome de la monocouche de cellules endothéliales. (C) Courbe de force de l'interaction cellule-cellule. D'après (Puech et al., 2006).

Il existe également un troisième approche qui a été employée, non pas pour déterminer les forces intercellulaires, mais pour évaluer la force de rupture entre une cellule (plaquette) et sa matrice (fibrinogène) grâce à des pinces optiques (Litvinov et al., 2002). Cette méthode a été utilisée pour étudier la force qui lie l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ exprimée à la surface d'une plaquette au fibrinogène lié de manière covalente à la surface d'une bille de latex (Figure 38). Ainsi, il a été montré que la force de rupture d'une molécule de fibrinogène en interaction avec une intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (purifiée ou à la surface d'une plaquette) se situe entre 60 et 150 pN. Par ailleurs, il a été déterminé que la stimulation des plaquettes par des agonistes augmente l'accessibilité des intégrines mais pas la force d'adhérence (Litvinov et al., 2002). On peut envisager d'utiliser ce type de montage avec des pinces optiques pour manipuler les

cellules et mesurer les forces d'adhérence intercellulaires. En effet, les pinces optiques trouvent de nombreuses applications en biologie et en médecine puisqu'elles permettent de « nano-manipuler » des objets, et notamment des cellules et de mesurer de forces de l'ordre de quelques picoNewtons (Coirault et al., 2003).

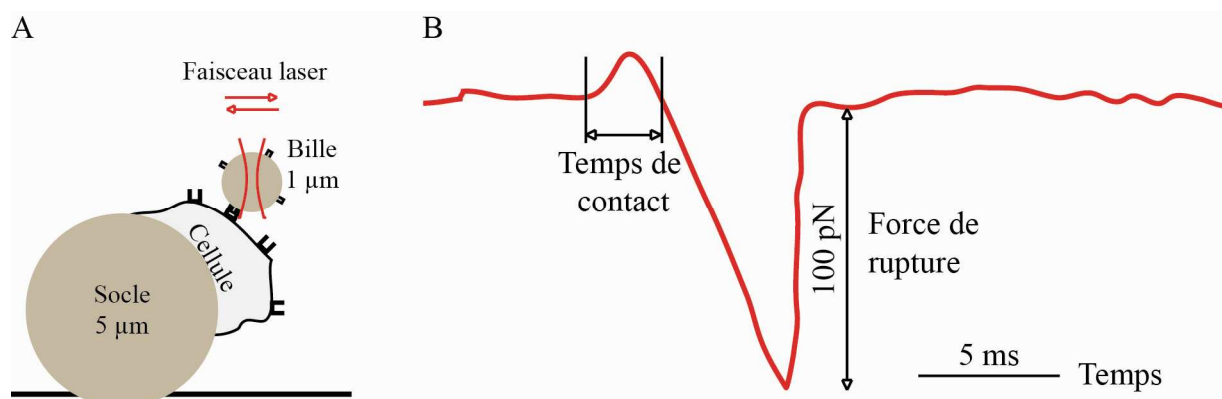


Figure 38 : Principe de mesure de force de rupture entre ligand et récepteur sur cellule vivante.

(A) Schéma du montage. La cellule (plaquette) est immobilisée sur un socle. La bille recouverte de fibrinogène est amenée au contact de la cellule grâce au faisceau laser. (B) Schéma d'une courbe de force issue de l'interaction entre la cellule de plaquette immobilisée et la bille recouverte de fibrinogène avec détermination de la force de rupture. D'après (Litvinov et al., 2002).

2. Objectifs du travail

De nombreuses recherches sont en cours pour identifier de nouveaux partenaires au niveau des jonctions adhérentes, notamment des partenaires capables de relier les structures jonctionnelles au cytosquelette d'actine et donc susceptibles de transmettre les contraintes mécaniques. En revanche, la contribution des efforts mécaniques à la maturation des jonctions et au remodelage des tissus est encore sous estimée. On sait cependant que la présence de forces est nécessaire à l'établissement des jonctions (Brevier et al., 2008; Ko and McCulloch, 2001).

L'objectif du travail initié dans ce domaine dans notre laboratoire est d'étudier la réponse mécanique des cellules endothéliales (isolées, éparses ou en monocouche) par deux approches complémentaires développées en parallèle. Plus précisément, nous cherchons à déterminer, d'une part, si la sensibilité à la rigidité du substrat d'une cellule individuelle est la même pour une monocouche de cellules endothéliales ayant engagé des adhérences intercellulaires à base de cadhérines. D'autre part, nous nous intéressons aux forces contractiles exercées par une monocouche de cellules dans des canaux déformables. En effet,

la déformation des parois des canaux permet indirectement de renseigner sur les forces contractiles développée par les cellules.

3. Développement technologique et méthodes utilisées

a. Gels de polyacrylamide de rigidité contrôlée

La première étape du développement technologique est de choisir, d'élaborer et de caractériser le substrat sur lequel les cellules endothéliales seront déposées afin de quantifier les forces qu'elles développent. Le choix du substrat s'est porté sur un gel de polyacrylamide. En effet, après fonctionnalisation, les cellules peuvent adhérer et se diviser pendant quelques jours sans y pénétrer. L'atout majeur des gels de polyacrylamide est de pouvoir en contrôler la rigidité (de quelques centaines de Pascal à 50 kPa). Pour ce travail ce n'est pas le ratio acrylamide/bis-acrylamide qui nous permet de contrôler la rigidité. En effet, nous avons choisi de réticuler les gels de polyacrylamide à l'aide d'initiateurs photosensibles qui nous permettent de contrôler la rigidité du substrat en faisant varier le temps d'insolation des échantillons et/ou la puissance de l'irradiation.

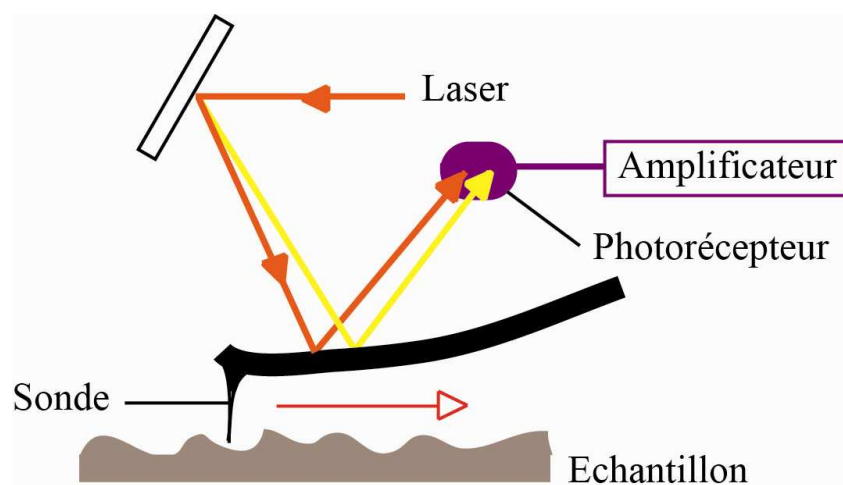


Figure 39 : Principe de l'AFM.

Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe « sonde » montée sur un microlevier flexible. La pointe balaie (scanne) la surface de l'échantillon et la déflexion du microlevier est détectée par un laser.

Pour étudier le comportement des cellules endothéliales et notamment la transmission de l'information mécanique, nous déposons les cellules sur un substrat à double rigidité avec pour objectif de limiter au maximum la zone de transition entre les deux rigidité (= changement abrupt de rigidité). Pour ce faire, nous réticulons le gel de polyacrylamide à

travers un masque de chrome dont l'épaisseur permet de moduler l'insolation et donc la rigidité du gel au cours de la réticulation aux UV.

La caractérisation de ce substrat est réalisée par Microscopie à Force Atomique (AFM). Le principe du microscope à force atomique est basé sur l'interaction avec une surface d'une pointe « sonde » qui est reliée à un microlevier flexible que l'on peut approcher ou éloigner de la surface de l'échantillon (**Figure 39**). Avec ce type de méthode, il est possible de mesurer la rigidité d'un échantillon ainsi que sa topographie.

b. Substrats en PDMS microstructurés

La seconde approche développée consiste à positionner une monocouche de cellules endothéliales dans des canaux de piliers déformables. Habituellement, les substrats microstructurés servent à mesurer les forces entre les cellules et la matrice (cf **Figure 30** et III.A.3. Substrats microstructurés pour l'étude des forces engagées par les cellules).

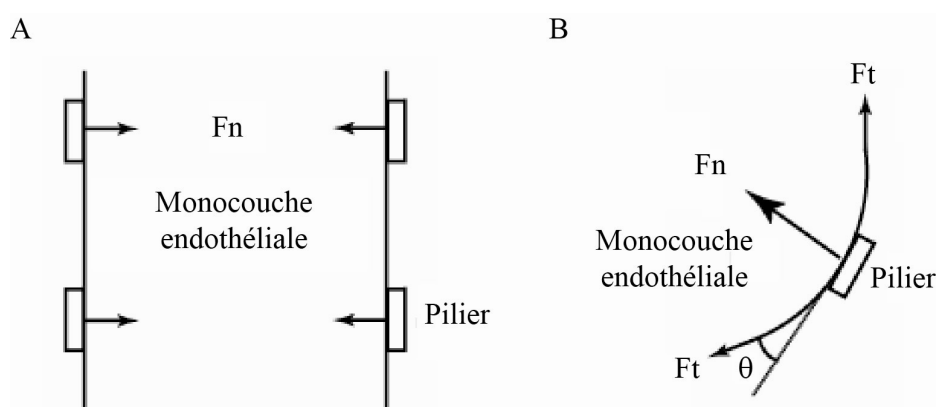


Figure 40 : Géométrie des canaux.

(A) Géométrie rectiligne donnant accès aux forces normales. (B) Géométrie circulaire donnant accès aux forces tangentielles.

Ici, l'originalité est de sonder les forces intercellulaires en canalisant les cellules entre les canaux de piliers et non sur les piliers. La déformation des parois des piliers fournit des renseignements sur les forces contractiles exercées. En effet, dans un régime de faible déformation la déflexion des piliers est proportionnelle à la force appliquée. Deux géométries de canaux ont été envisagées : rectiligne et circulaire. Les forces normales aux parois cellulaires défléchiront les parois de canaux rectilignes, tandis que les forces tangentielles devraient être accessibles avec une géométrie circulaire (Figure 40 : Géométrie des canaux.**Figure 40**).

Les piliers sont constitués de PDMS, un élastomère biocompatible, transparent et possédant une large gamme de rigidité. La réalisation de tels substrats se fait en plusieurs étapes successives résumées sur la **Figure 41**.

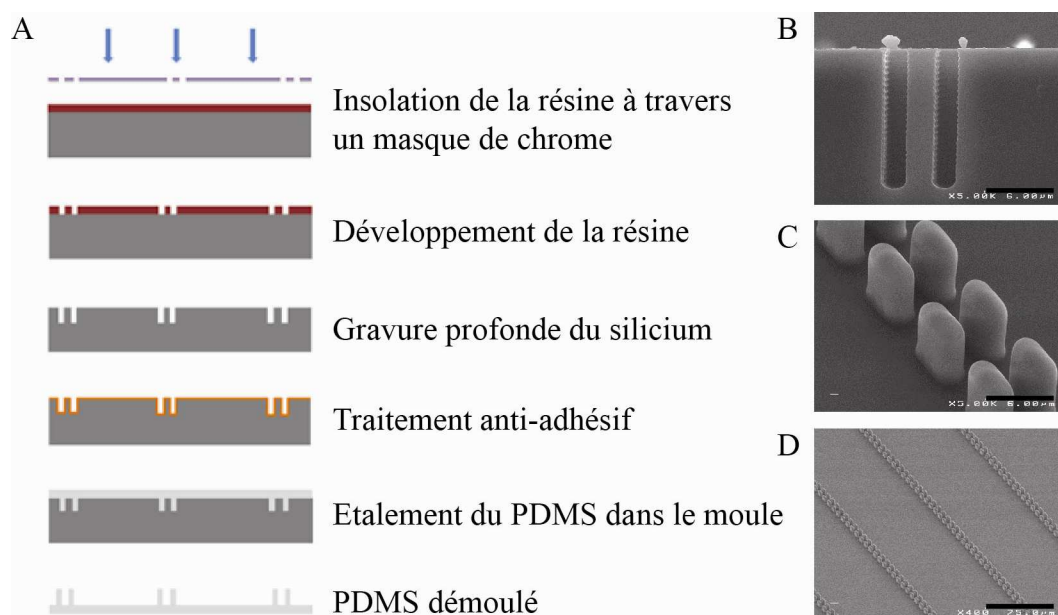


Figure 41 : Fabrication des substrats en PDMS

(A) Les différentes étapes de fabrication de piliers de PDMS. Le moule est réalisé en silicium. La première phase du procédé est appelée lithographie et se déroule en trois étapes. Afin de graver les motifs de piliers dans le silicium, celui-ci est d'abord recouvert d'une résine photosensible. Un masque de chrome aux motifs des piliers est apposé par-dessus avant insolation aux rayons UV ($\lambda \approx 365$ nm). L'exposition aux rayons UV crée des réactions au sein de la résine et engendre des modifications chimiques qui modifient la solubilité de la résine. Pour développer le motif des piliers sur la résine, celle-ci est mise en contact avec un solvant qui a pour but de dissoudre toutes les zones qui ont été exposées aux rayons UV et garde intact les zones protégées par le masque de chrome. Le motif étant imprimé sur la résine, le procédé utilisé pour graver le silicium est la gravure ionique DRIE (Deep Reactive Ion Etching). Ce type de gravure sèche utilise des plasma (gaz très réactifs constitués d'un mélange d'électrons, d'ions, d'atomes et de molécules) pour graver le moule des piliers dans le silicium. Le moule obtenu est traité par une solution anti-adhésive avant d'être rempli par une solution de PDMS. La dernière du procédé de fabrication est le démoulage. (B) (C) et (D) Clichés en microscopie électronique à balayage du moule (B) barre d'échelle 6 μ m et des piliers de PDMS à différents grossissements (C) barre d'échelle 6 μ m et (D) barre d'échelle 75 μ m.

Après obtention des substrats micropatternés, une étape très importante avant la mise en culture des cellules sur les substrats est la fonctionnalisation. En effet, pour canaliser les cellules au fond des canaux, il faut rendre attractives certaines zones du substrat (le PDMS est hydrophobe et donc répulsif pour les cellules) et répulsives d'autres zones, le haut des piliers par exemple. Pour ce faire, le substrat de PDMS est, dans un premier temps, rendu hydrophile par un plasma oxygène immédiatement suivi d'une immersion dans la fibronectine pour

favoriser l'adhérence des cellules. A l'inverse, le haut des piliers est rendu répulsif par une solution de PLL-PEG (Poly(L-Lysine)-Poly(Ethylène Glycol)) afin d'éviter que les cellules ne s'installent sur les piliers au lieu de s'intercaler entre les canaux.

4. Résultats préliminaires

a. Influence de la rigidité matricielle sur les adhérences intercellulaires

L'observation d'HUVECs isolées sur des gels de polyacrylamide à double rigidité a permis de mettre en évidence un comportement cellulaire défini : les cellules individuelles sont guidées par le gradient de rigidité.

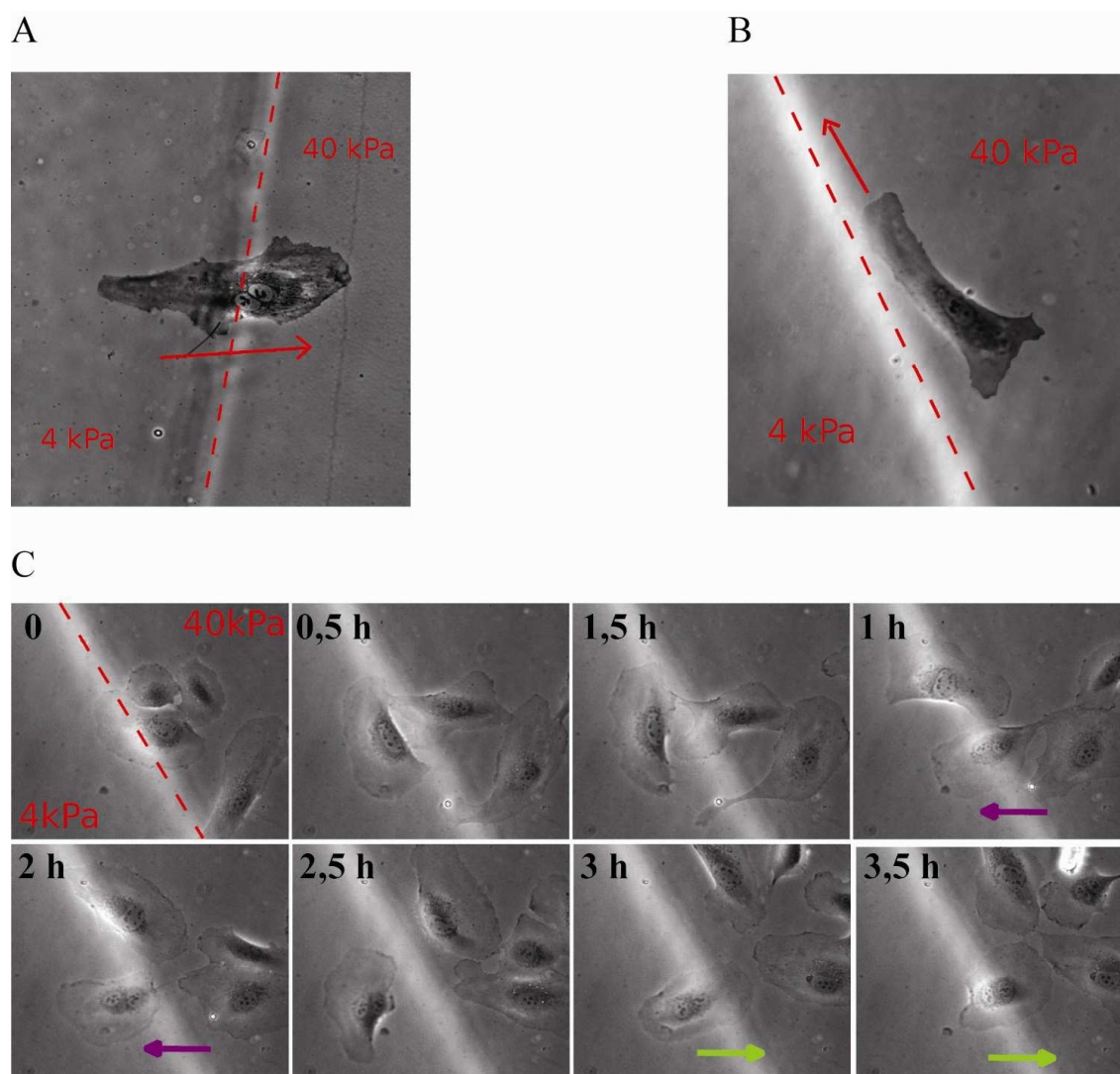


Figure 42 : Comportement des HUVECs sur un substrat à double rigidité.

(A) Migration préférentielle de la partie molle vers la partie rigide. (B) Alignement cellulaire parallèle à la frontière côté partie rigide. (C) Comportement d'une population de cellules au cours du temps.

présence (flèche violette) et en absence (flèche verte) de contact intercellulaires.

En effet, comme illustré sur la **Figure 42 A**, les HUVECs de la partie molle du substrat ont tendance à traverser la frontière de rigidité pour migrer sur la partie plus ferme. Inversement, les HUVECs présentes sur la partie rigide du substrat ne traversent pas le gradient de rigidité et s'alignent parallèlement à la frontière (**Figure 42 B**). Ces résultats indiquent que les HUVECs sont sensibles à la rigidité du substrat et migrent préférentiellement sur un substrat rigide. Ceci tend à confirmer les résultats obtenus pour les cellules musculaires lisses (**Isenberg et al., 2009**).

A l'échelle d'une population de cellule, le comportement est identique à celui observé sur cellules isolées si les cellules en présence n'ont pas établis de contact intercellulaire. En revanche, dès que les cellules commencent à établir des contacts entre elles, il semblerait qu'elles perdent leur sensibilité à la rigidité du substrat. En effet, les cellules ayant des contacts intercellulaires avec les cellules voisines traversent la frontière séparant les zones ayant des rigidités différentes (**Figure 42 C** flèche violette) et retournent sur la partie rigide en absence de contacts avec d'autres cellules (**Figure 42 C** flèche verte). Par ailleurs, lorsque la densité cellulaire augmente, les cellules sont réparties de manière homogène entre la partie molle et la partie rigide.

Une autre approche a également été testée pour appréhender la relation entre adhérence cellule-matrice et adhérence cellule-cellule. Sur des substrats de polyacrylamide de rigidité uniforme, une population éparse de cellules HUVECs a étéensemencées afin d'observer leur comportement. L'imagerie en contraste de phase permet de suivre le comportement macroscopique des cellules entre elles, quant à l'imagerie en fluorescence, elle permet de suivre le comportement des billes fluorescentes incorporées préalablement dans le substrat pour évaluer l'impact des cellules sur la matrice extracellulaire. Plus précisément, l'objectif est de mesurer la dynamique des champs de forces transmises à la matrice extracellulaire en présence et en absence de jonctions intercellulaires. C'est ainsi qu'une technique de microscopie à force de traction a été mise au point en collaboration avec le groupe d'Hélène Delanoë-Ayari afin de suivre les déplacements de la surface du substrat (matérialisé par les billes) en réponse aux tractions cellulaires exercées par les HUVECs. L'idée est de mesurer expérimentalement la déformation du motif visuel (constitué par les billes fluorescentes incorporées dans le gel) afin d'extraire le champ de force à partir du champ de déformation. La méthode utilisée consiste à inverser l'équation d'élasticité pour mesurer les forces cellulaires et exprimer la force sous la forme d'une combinaison linéaire

des composantes de déplacements. De manière schématique et simplifiée, l'équation d'élasticité s'écrit : $U = M \times F$ où U est le déplacement et $M \times F$, le produit matriciel entre une matrice de transfert et le vecteur force. En inversant l'équation d'élasticité on obtient : $F = U \times M^{-1}$, ce qui nous permet à partir des mesures expérimentales du déplacements des billes de remonter aux forces cellulaires.

Voici en **Figure 43** les premiers résultats obtenus pour un doublet d'HUVEC, en absence de contact cellulaire au départ, et au cours de l'établissement des jonctions intercellulaires. En absence de contact, les cellules ne présente pas de polarisation particulière et sont dites « isotropes ». En revanche, à mesure que les contacts intercellulaires se forment, on peut observer un comportement asymétrique des deux cellules en contact. En effet, l'une d'entre elle acquière une certaine polarité, tandis que la seconde conserve sa forme isotropique. Par ailleurs, les champs de forces mesurés montrent que l'apparition des contacts cellulaires s'accompagne localement d'une réduction des forces au niveau de la jonction naissante. Ces résultats vont dans le sens des travaux publiés par Maruthamuthu qui montrent qu'en présence de jonctions intercellulaires entre deux cellules MDCK, les forces transmises à la matrice diminuent localement (**Maruthamuthu et al., 2011**).

Ces résultats démontrent clairement d'une part, que les cellules endothéliales sentent la rigidité de leur substrat et d'autre part qu'en présence de jonctions intercellulaires, le comportement des cellules endothéliales vis-à-vis de la matrice extracellulaire semble modifié. En effet, celles-ci perdent la sensibilité à la rigidité du substrat en présence de contacts avec d'autres cellules. Parallèlement, il y a une diminution locale des forces qu'elles transmettent à la matrice. Pour poursuivre ces travaux sur la sensibilité des cellules endothéliales à la rigidité, nous envisageons d'étudier, au niveau moléculaire, la réponse des cellules en fonction de la rigidité du substrat. Brièvement, il sera possible de suivre les modifications de composition protéique au niveau des jonctions adhérentes et des plaques d'adhérence focale en filmant le comportement des principales protéines impliquées dans les jonctions intercellulaires et les plaques d'adhérence focale. Par exemple, la localisation subcellulaire de la taline, principale partenaire cytoplasmique des intégrines, pourra être suivie en fonction de la rigidité du substrat et en fonction de l'établissement de contacts intercellulaires. On pourra ainsi déterminer comment les cellules ajustent leur comportement en fonction de la rigidité du substrat et de l'absence/présence de jonctions intercellulaires.

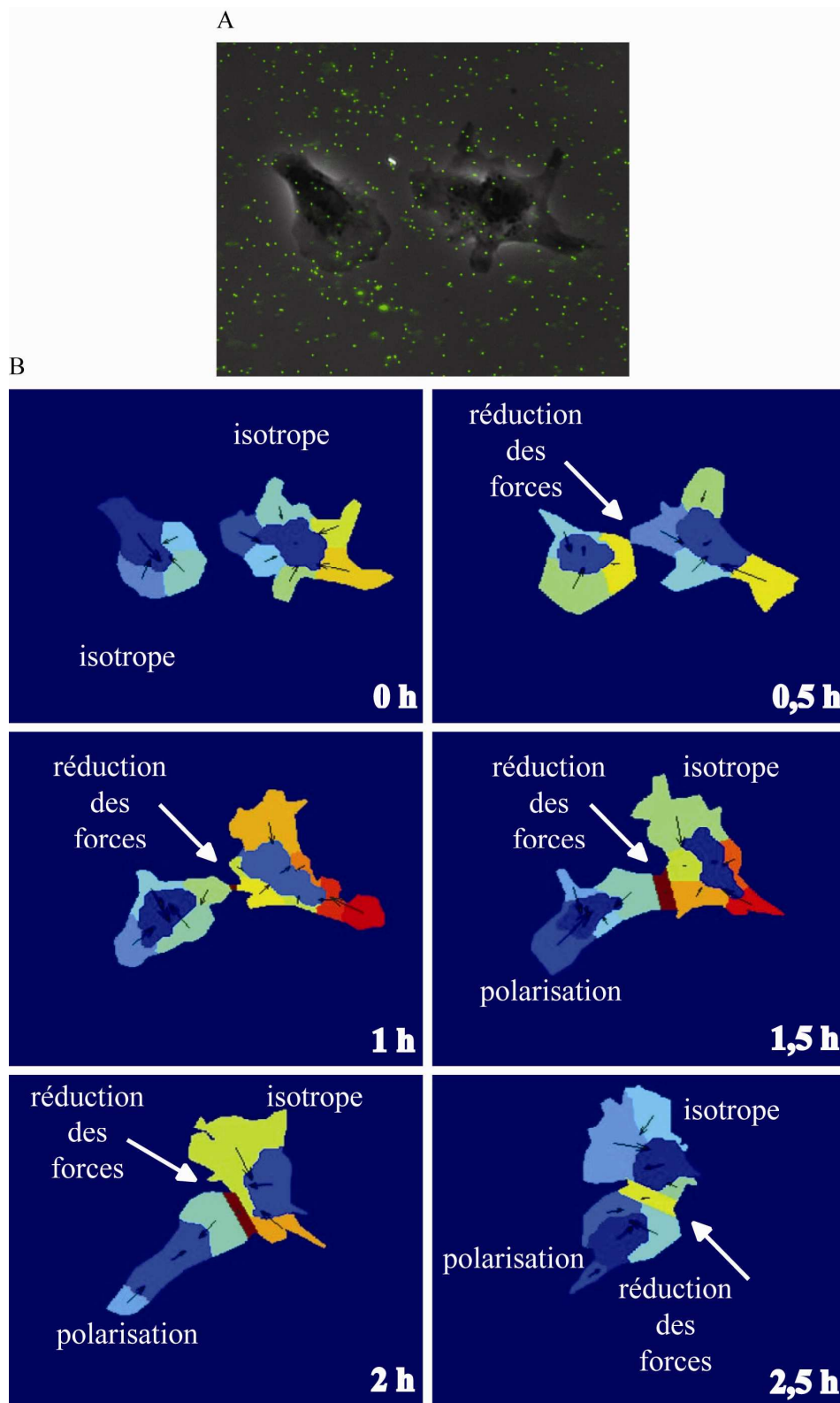


Figure 43 : Analyse des données de microscopie à force de traction

(A) Superposition d'une image en contraste de phase de cellules HUVECs avec une image en fluorescence des billes incorporées au substrat. (B) Résultat de l'analyse des déplacements de billes. Les cellules ont été découpées en plusieurs zones. Les flèches noires représentent la force résultante à l'intérieur de la zone, issue de l'analyse du déplacement des billes dans la matrice.

b. Détermination de la contractilité d'une monocouche

La deuxième approche de ce projet fait appel à un autre type de substrat : le PDMS. Les substrats en PDMS réalisés pour accueillir des cultures de cellules HUVEC sont composés de canaux et de piliers déformables qui doivent permettre de déterminer la force engendrée par la contractilité d'une monocouche endothéliale.

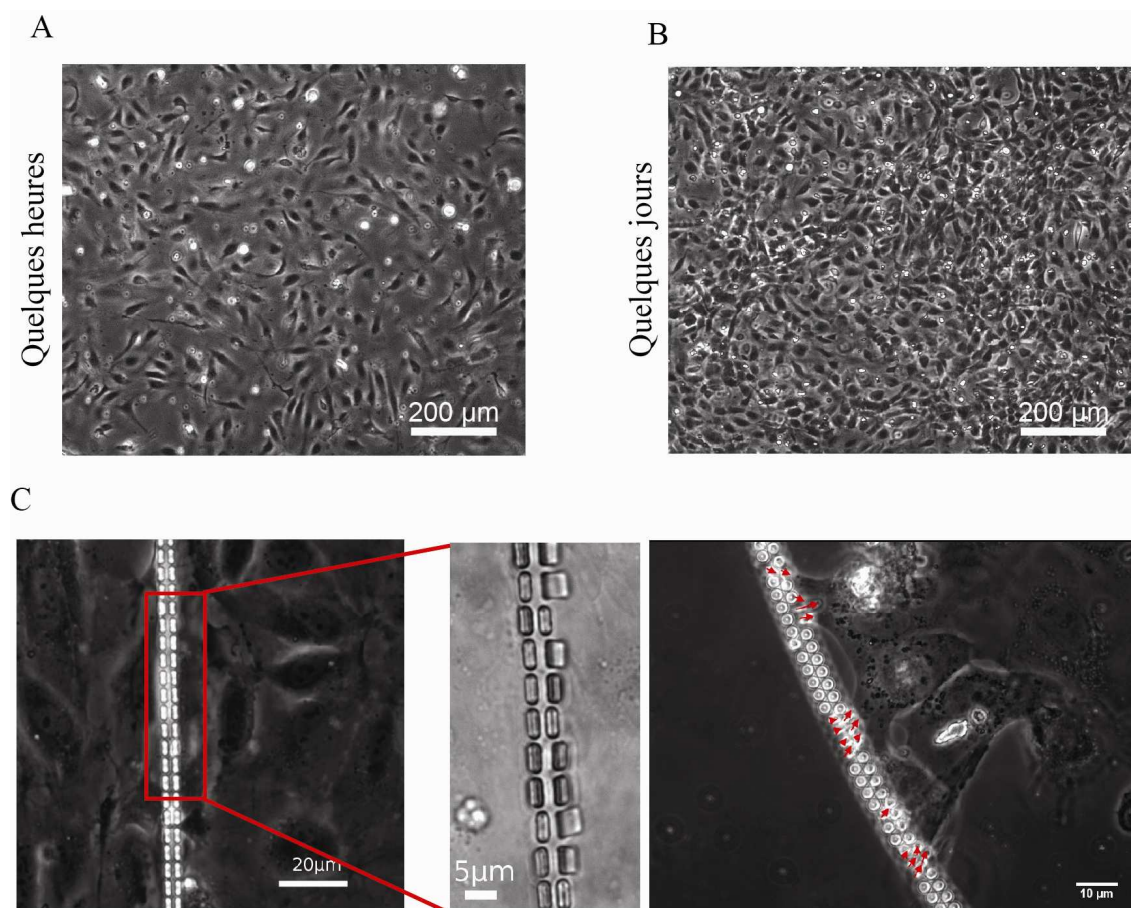


Figure 44 : Premiers essais de cultures d'HUVECs sur les canaux déformables

Images en contraste de phase de cellules HUVECs quelques heures (A) et quelques jours (B) après ensemencement sur des substrats plans de PDMS. (C) Déflexions des piliers induites par les HUVECs sur des canaux de géométrie rectiligne et circulaire.

Jusqu'à aujourd'hui, il était souhaitable que les cellules adhèrent et évoluent « sur » les piliers puisque ce genre de substrat était principalement utilisé pour étudier les forces transmises par les cellules à la matrice (**Liu et al., 2010a**). L'originalité de ce travail est de vouloir « canaliser » les cellules entre les canaux afin d'avoir accès aux forces intercellulaires développées par les cellules. Ces substrats fonctionnalisés avec de la fibronectine ont été validés pour la culture d'HUVECs. En effet, les cellules ont une bonne capacité d'adhérence sur le substrat (**Figure 44 A**) et sont aisément amplifiées pendant plusieurs jours (jusqu'à sept

jours) (**Figure 44 B**). Par ailleurs, on peut également voir le comportement des cellules vis-à-vis des piliers sur la **Figure 44 C**. Les déflexions de piliers sur canaux de géométrie rectiligne et circulaire sont facilement visualisées sur des clichés de microscopie en contraste de phase (**Figure 44 C**).

Cependant, alors que nous attendions un étalement des cellules sur le fond du substrat entre les piliers, l'imagerie confocale nous apporte des images qui montrent qu'en réalité les HUVECs s'installent sur les piliers contrairement à ce qui était attendu (**Figure 45**).

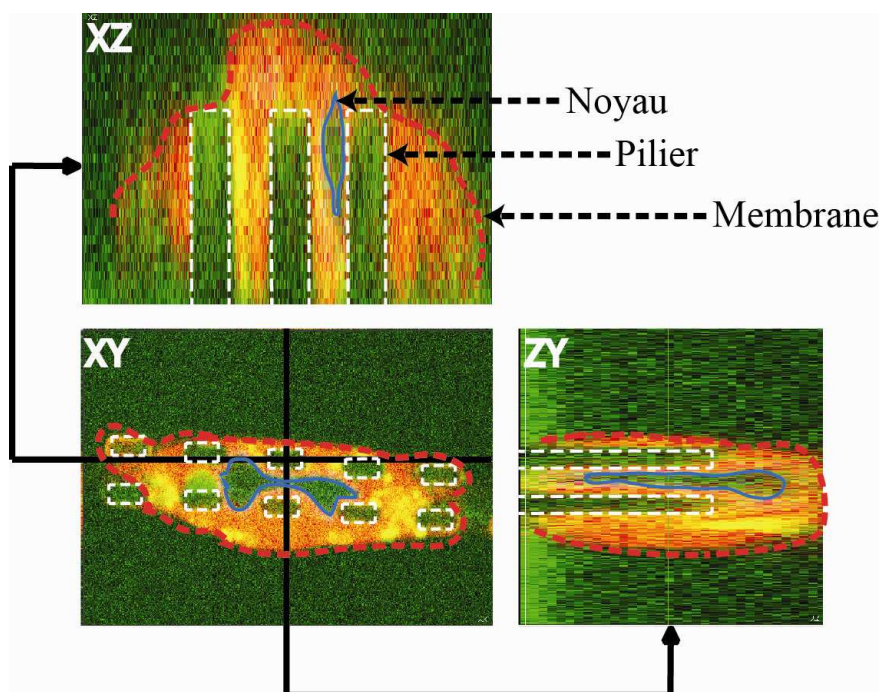


Figure 45 : Vue en 3 dimensions du positionnement d'une cellule HUVEC sur les piliers

Image confocale incluant des coupes en Z qui permettent de visualiser dans les trois dimensions le positionnement de la cellule HUVEC par rapport aux piliers.

Cette constatation est un sérieux obstacle à la détermination de la contractilité d'une monocouche endothéliale. En adhérant à la surface des piliers, il est impossible de mesurer une déflexion des piliers qui reflète les forces intercellulaires mises en jeu. Pour contourner le problème, un important travail de mise au point a été réalisé afin de trouver un montage associant zones « attractives » et zones « répulsives » pour les cellules. Ce nouveau montage est schématisé sur la **Figure 46 A**. Simplement, au lieu de réaliser des rangées de deux piliers côte à côte, on intercale un canal plein de PDMS entre deux rangées de piliers. En rendant, ces canaux « pleins » répulsifs pour les cellules grâce au PLL-PEG, les cellules n'ont pas d'autres choix que de s'installer dans les canaux « vides » fonctionnalisés avec la fibronectine. Si le procédé pour réaliser un tel substrat est au point comme le montre le cliché

en microscopie électronique à balayage (**Figure 46 B**), l'analyse du comportement des cellules sur ce genre de capteur de force est en cours d'étude.

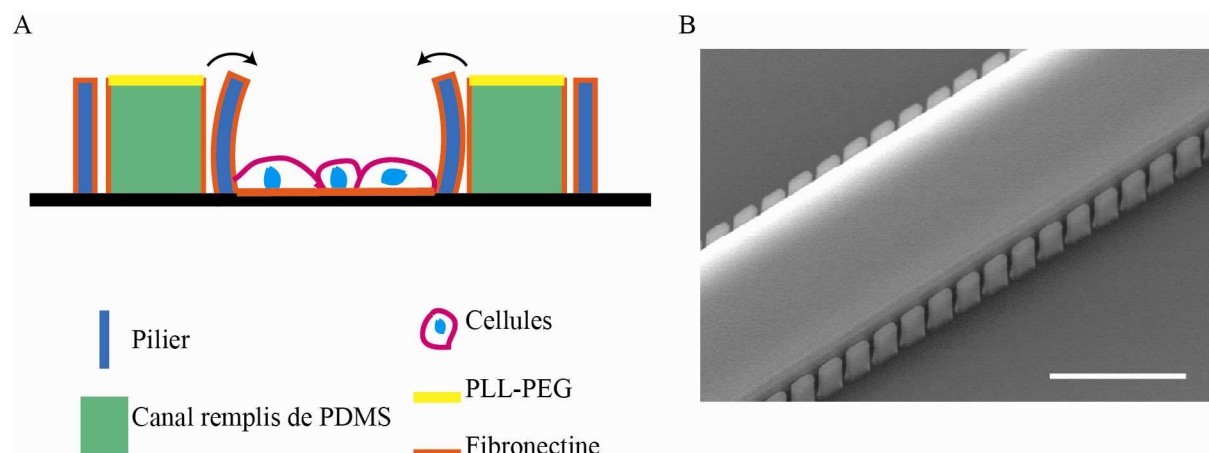


Figure 46 : Nouveau système de canaux déformables

(A) Représentation schématique du montage alliant zones attractives fonctionnalisées avec de la fibronectine et zones répulsives fonctionnalisées avec le PLL-PEG. (B) Cliché en microscopie à balayage électronique du système (barre d'échelle 30 µm).

5. Perspectives du projet

Ce projet, développé autour de forces intercellulaires par deux approches complémentaires, permettra, à terme, d'étudier le couplage entre la rigidité du substrat et la contractilité de la monocouche. En effet, l'objectif final est de tapisser le fond des canaux avec un hydrogel de polyacrylamide de rigidité contrôlée (**Figure 47**). Il sera ainsi possible de mettre en relation la contractilité cellulaire avec la composition et la dynamique de protéines spécifiques des jonctions adhérentes.

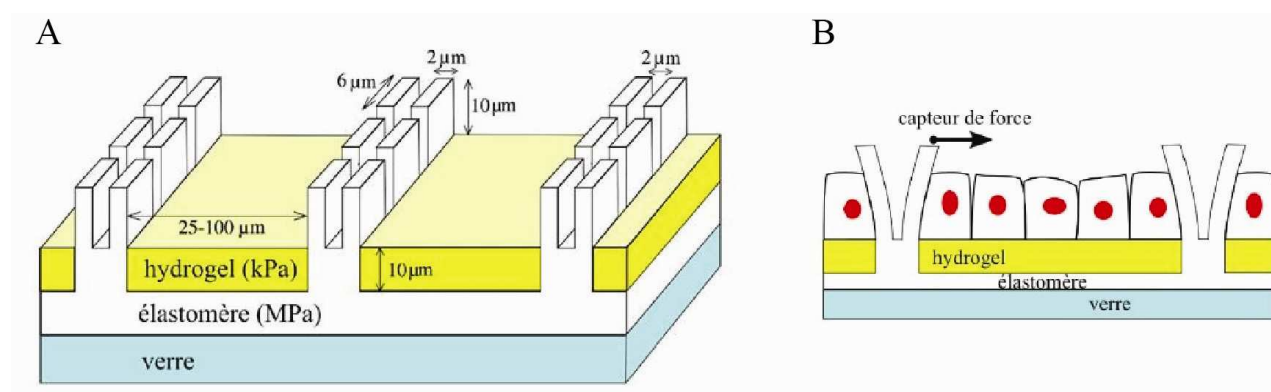


Figure 47 : Modélisation du capteur de force

(A) Représentation schématique de canaux déformables (B) Vue en coupe du capteur de force montrant comment la contraction des cellules déforme les parois latérales des canaux.

Ce projet collaboratif permet dans un premier temps d'acquérir de nouvelles connaissances sur le comportement cellulaires vis-à-vis de l'environnement mécanique avec un modèle cellulaire qui nous intéresse tout particulièrement à savoir un endothélium reconstitué *in vitro*. Par ailleurs, il sera vraiment intéressant d'utiliser toutes les techniques développées dans ce projet pour caractériser au mieux le rôle d'EPLIN dans les cellules endothéliales. En effet, comme nous avons pu le montrer dans la première partie des résultats expérimentaux, il semble que le phénotype provoqué par l'absence d'EPLIN dans une matrice de matrigel soit en lien avec les forces mises en jeu au cours de l'élaboration des structures précapillaires. Ainsi, comparer la contractilité d'une monocouche endothéliale avec et sans EPLIN nous permettra d'affirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une augmentation des forces transmises aux jonctions intercellulaires potentiellement responsable des cassures au sein du réseau vasculaire.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce manuscrit est l'aboutissement de quatre années de travaux qui ont débuté en 2007 à la suite de la thèse de Stéphanie Heyraud. Cette dernière a montré, notamment par analyse protéomique, la complexité de la jonction adhérente interendothéliale en apportant de nouveaux éléments permettant d'appréhender son architecture et sa biologie. En effet, grâce à l'analyse protéomique, il a été découvert que le complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine est relié à de nombreuses protéines liant l'actine. Ces résultats laissaient entrevoir que la connexion du complexe à base de VE-cadhérine au cytosquelette d'actine n'était pas constituée d'un seul et unique lien protéique mais d'une multiplicité de liens à découvrir et à caractériser. D'ailleurs, dès 2005, la littérature remettait en cause le modèle figé selon lequel l' α -caténine était capable d'assumer seule la fonction de liaison du complexe cadhérine/ β -caténine au cytosquelette d'actine (**Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005b**).

Dans ce contexte et suite à l'analyse protéomique réalisée au laboratoire, Stéphanie Heyraud a montré que l'annexine A2 est à l'origine d'une connexion entre le complexe à base de VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine (**Heyraud et al., 2008**). Cette interaction permet d'arrimer le complexe à base de VE-cadhérine aux radeaux de cholestérol dans lesquels l'annexine A2 est enchâssée mais aussi de connecter indirectement le complexe de VE-cadhérine au cytosquelette d'actine, l'annexine A2 étant une « actin binding protein ». Ce lien a pour effet de restreindre la diffusion latérale du complexe à base de VE-cadhérine au niveau de la membrane plasmique et de stabiliser les jonctions adhérentes des cellules endothéliales confluentes.

Toujours au laboratoire, Sébastien Almagro a par ailleurs montré que la protéine moteur myosine X est une autre protéine qui sert d'intermédiaire entre le complexe à base de VE-cadhérine et les microfilaments d'actine (cf **Annexe**) (**Almagro et al., 2010**). En interagissant avec le complexe VE-cadhérine/caténines, cette protéine déplace des « clusters » de VE-cadhérine le long des filopodes en utilisant les filaments d'actine intrafilopodiaux comme des rails. Lorsque ces « clusters » atteignent l'extrémité des filopodes, ils s'y maintiennent alors que ces derniers s'allongent ou se rétractent. L'émission de filopodes permet d'élaborer des ponts entre les cellules constituant ainsi les premiers contacts intercellulaires : les molécules de VE-cadhérine situées à l'extrémité des filopodes élaborent des interactions homophiliques avec les molécules de VE-cadhérine de la cellule ciblée. Ces premiers contacts permettent alors à de nouvelles molécules de VE-cadhérine d'être engagées à leur tour dans des interactions homophiliques. De cette façon, le transport des molécules de VE-cadhérine le long des filopodes par la myosine X permet d'initier les contacts entre cellules voisines.

Enfin, en 2008, l'équipe de Takeichi a apporté un nouvel élément de compréhension sur le lien entre complexe cadhérine/ β -caténine et microfilaments d'actine. Cette équipe a décrit la protéine EPLIN comme étant capable de relier le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine au cytosquelette d'actine en s'associant simultanément à l' α -caténine et à l'actine, stabilisant ainsi le réseau d'actine corticale des cellules épithéliales (Abe and Takeichi, 2008).

Il ressort de ces différentes études une multiplicité d'interactions existant entre le complexe à base de VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine qui est à la base du remodelage des jonctions adhérentes ou de leur stabilisation (Figure 48).

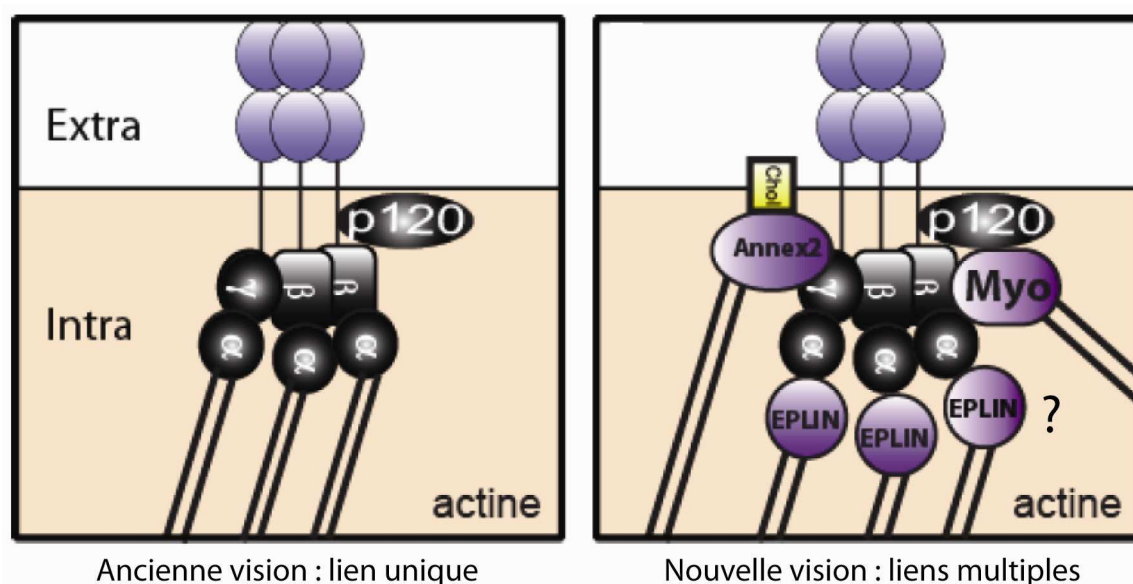


Figure 48 : Connexions entre le complexe VE-cadhérine/caténines et le cytosquelette d'actine.

L'ancienne vision faisait état d'un unique lien entre le complexe à base de VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine. En réalité, le mécanisme d'ancrage du complexe jonctionnel à l'actine est plus sophistiqué comme le suggèrent plusieurs études (Almagro et al., 2010; Drees et al., 2005; Heyraud et al., 2008; Yamada et al., 2005b). Dans ce nouveau schéma, EPLIN pourraient établir une connexion entre le complexe VE-cadhérine/caténines et le cytosquelette d'actine comme elle le fait pour le complexe E-cadhérine/caténines (Abe and Takeichi, 2008).

C'est dans ce contexte bibliographique et propre à notre équipe que mon projet de thèse a débuté. Nous nous sommes alors demandé si EPLIN pouvait contribuer à relier le cytosquelette d'actine au complexe jonctionnel dans un modèle d'endothélium reconstitué. Les premiers éléments que nous avons apportés attestent qu'EPLIN, sous ses deux isoformes, est exprimée tant au niveau ARN que protéique dans différents modèles cellulaires endothéliaux (article, figure 1) contrairement à ce qui avait pu être publié auparavant (Jiang et al., 2008; Maul and Chang, 1999; Sanders et al., 2010). Nous avons également localisé

cette protéine au niveau des jonctions intercellulaires matures là où s'expriment également l' α -caténine et la VE-cadhérine (**article, figures 2 et 3**). Par voie biochimique, il nous a été possible d'impliquer EPLIN dans le complexe jonctionnel endothélial (**article, figure 4 A à E**) et de prouver l'interaction entre EPLIN et α -caténine, et ce indépendamment de l'actine (**article, figure 4 F et G**).

Pour élucider le rôle d'EPLIN au sein de l'endothélium, nous avons eu recours à divers tests fonctionnels (adhérence, migration, prolifération, capacité à former des structures pré-capillaires). D'après nos résultats, il semblerait qu'EPLIN ne modifie pas les capacités d'adhérence, de migration et de prolifération des cellules endothéliales (**article, figure 7**). En revanche, il apparaît très clairement que le KD (Knock Down) d'EPLIN entrave la formation de structures pseudo-vasculaires en matrice de matrigel. En effet, les structures préformées dans les temps précoces régressent en raison de cassures intervenant au sein du réseau (**article, figure 9**). Ce résultat majeur peut donner lieu à plusieurs interprétations. Nous avons tout d'abord émis l'hypothèse qu'en absence d'EPLIN, la VE-cadhérine n'était plus stabilisée au niveau des jonctions intercellulaires provoquant ainsi une instabilité et une fragilité des structures jonctionnelles qui pourraient expliquer les ruptures observées. Néanmoins, les expériences de FRAP que nous avons réalisées nous ont permis d'écarter cette hypothèse, puisque la mobilité de la VE-cadhérine à la membrane est inchangée en présence ou en absence d'EPLIN (**article, figure 8**).

D'autres interprétations restent possibles pour expliquer les cassures observées au cours du remaniement des structures pseudo-vasculaires en matrice de matrigel en l'absence d'EPLIN. Ainsi, il est possible qu'en absence d'EPLIN, le mécanisme de mécanotransduction régie par l' α -caténine soit perturbé (**Yonemura et al., 2010**).

Les différentes expériences menées conjointement sur EPLIN et vinculine indiquent une coopération entre les deux protéines. L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus peut être schématisé par le modèle proposé sur la **figure 49**.

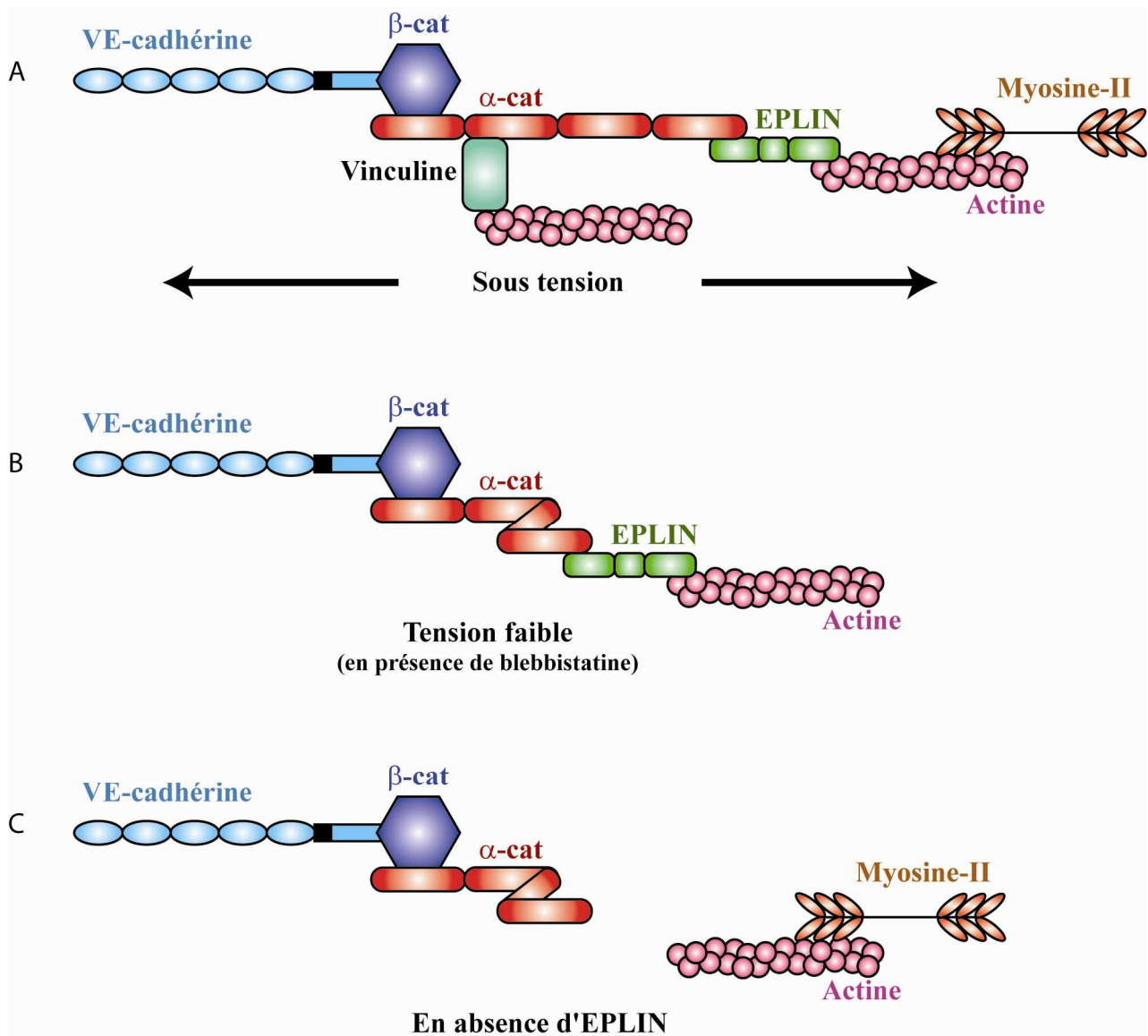


Figure 49 : Modèle de mécano-transduction compatible avec les résultats expérimentaux

En temps normal, les cellules endothéliales organisées sont soumises aux tensions provenant de l'intérieur de la cellule par le cytosquelette d'actine et de l'extérieur de la cellule par les liaisons homotypiques entre molécules de VE-cadhérine (**figure 49. A**). Sous tension, l' α -caténine est alors présente sous sa forme étirée et peut interagir librement avec la vinculine et EPLIN. En revanche, lorsque ces tensions diminuent, par exemple lorsque la contractilité dépendante de la Myosine II est inhibée par la blebbistatine, le site d'interaction de l' α -caténine pour la vinculine est masqué rendant l'interaction α -caténine/vinculine impossible (**figure 49. B**). Enfin, en absence d'EPLIN, l' α -caténine n'interagit ni avec la vinculine, ni avec EPLIN, rendant le dialogue entre le cytosquelette d'actine et le complexe jonctionnel impossible (**figure 49. C**). Cette absence de dialogue pourrait expliquer les

défauts d'organisation observés en absence d'EPLIN sur le cytosquelette d'actine et sur la formation des réseaux pseudo-vasculaires en matrice de matrigel.

L'ensemble des résultats obtenus au sein de l'équipe a fortement contribué à envisager la jonction interendothéliale sous un nouveau jour. Jusqu'en 2005, l' α -caténine représentait le seul lien direct entre le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine. Cette vision figée du lien entre jonction et cytosquelette est remise à jour par différents résultats acquis au laboratoire qui contribuent à une nouvelle architecture de la jonction interendothéliale (**figure 50**). Il s'avère, en effet, qu'il existe une multiplicité de liens permettant l'ancrage du cytosquelette d'actine aux jonctions qui évolue en fonction de l'état de maturation de la jonction, des tensions environnantes, des partenaires en présence.

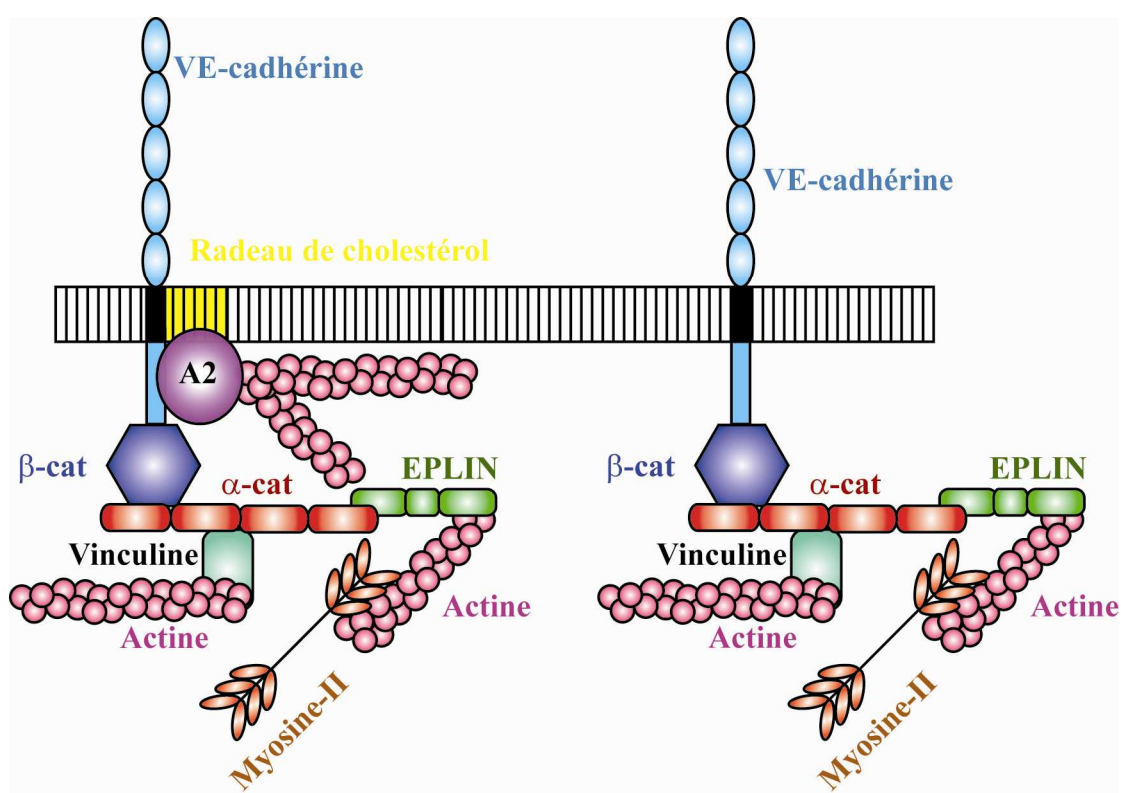


Figure 50 : Nouvelle architecture de la jonction interendothéliale.

Par ailleurs les travaux réalisés en collaboration avec le Laboratoire des Technologies pour la Microélectronique (LTM) nous permettent d'envisager à moyen terme une nouvelle approche pour élucider la contribution de différents acteurs (EPLIN, vinculine, Annexine A2) aux forces exercées par les cellules en fonction de la composition moléculaire des jonctions. On pourra par exemple déterminer si la contractilité des cellules endothéliales en absence d'EPLIN est plus importante qu'en présence d'EPLIN en déposant des cellules contrôle ou dépourvues d'EPLIN dans des canaux de PDMS. Ces données résultant de travaux menés en

parallèle par des biologistes, des physiciens et des chimistes permettraient d'évaluer le comportement cellulaire en absence de chacun des partenaires pour évaluer leur contribution respective à la transmission des forces.

Ces nouvelles technologies devraient permettre d'appréhender de manière plus précise le mécanisme par lequel EPLIN renforce les jonctions intercellulaires en leur permettant de répondre aux tensions qui s'exercent sur le réseau vasculaire.

Bibliographie

- Abe, K., and Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 13-19.
- Abraham, S., Yeo, M., Montero-Balaguer, M., Paterson, H., Dejana, E., Marshall, C.J., and Mavria, G. (2009). VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Curr Biol* *19*, 668-674.
- Adams, R.H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews* *8*, 464-478.
- Ahrens, T., Lambert, M., Pertz, O., Sasaki, T., Schulthess, T., Mege, R.M., Timpl, R., and Engel, J. (2003). Homoassociation of VE-cadherin follows a mechanism common to "classical" cadherins. *Journal of molecular biology* *325*, 733-742.
- Aird, W.C. (2007a). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research* *100*, 158-173.
- Aird, W.C. (2007b). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* *100*, 174-190.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. Microtubule +TIPs at a glance. *Journal of cell science* *123*, 3415-3419.
- Al-Kurdi, R., Gulino-Debrac, D., Martel, L., Legrand, J.F., Renault, A., Hewat, E., and Venien-Bryan, C. (2004). A soluble VE-cadherin fragment forms 2D arrays of dimers upon binding to a lipid monolayer. *Journal of molecular biology* *337*, 881-892.
- Alitalo, K., Tammela, T., and Petrova, T.V. (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* *438*, 946-953.
- Allingham, M.J., van Buul, J.D., and Burridge, K. (2007). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol* *179*, 4053-4064.
- Almagro, S., Durmort, C., Chervin-Petinot, A., Heyraud, S., Dubois, M., Lambert, O., Maillefaud, C., Hewat, E., Schaal, J.P., Huber, P., *et al.* (2010). The motor protein myosin-X transports VE-cadherin along filopodia to allow the formation of early endothelial cell-cell contacts. *Molecular and cellular biology* *30*, 1703-1717.
- Amos, L.A. (2004). Microtubule structure and its stabilisation. *Organic & biomolecular chemistry* *2*, 2153-2160.
- Anastasiadis, P.Z. (2007). p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochimica et biophysica acta* *1773*, 34-46.

- Angelini, D.J., Hyun, S.W., Grigoryev, D.N., Garg, P., Gong, P., Singh, I.S., Passaniti, A., Hasday, J.D., and Goldblum, S.E. (2006). TNF- α increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *American journal of physiology* 291, L1232-1245.
- Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., and Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 12, 267-274.
- Athman, R., Louvard, D., and Robine, S. (2002). The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G496-502.
- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W.W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 16, 1055-1069.
- Baldwin, H.S. (1996). Early embryonic vascular development. *Cardiovasc Res* 31 *Spec No*, E34-45.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15, 102-111.
- Barandon, L., Couffignal, T., Ezan, J., Dufourcq, P., Costet, P., Alzieu, P., Leroux, L., Moreau, C., Dare, D., and Duplaa, C. (2003). Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA. *Circulation* 108, 2282-2289.
- Baumeister, U., Funke, R., Ebnet, K., Vorschmitt, H., Koch, S., and Vestweber, D. (2005). Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *The EMBO journal* 24, 1686-1695.
- Baumgartner, W., Hinterdorfer, P., Ness, W., Raab, A., Vestweber, D., Schindler, H., and Drenckhahn, D. (2000). Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4005-4010.
- Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current opinion in cell biology* 15, 525-530.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews* 84, 869-901.
- Beningo, K.A., and Wang, Y.L. (2002). Flexible substrata for the detection of cellular traction forces. *Trends in cell biology* 12, 79-84.
- Berg, J.S., and Cheney, R.E. (2002). Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nature cell biology* 4, 246-250.
- Berg, J.S., Derfler, B.H., Pennisi, C.M., Corey, D.P., and Cheney, R.E. (2000). Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *Journal of cell science* 113 *Pt 19*, 3439-3451.

- Bibert, S., Jaquinod, M., Concord, E., Ebel, C., Hewat, E., Vanbelle, C., Legrand, P., Weidenhaupt, M., Vernet, T., and Gulino-Debrac, D. (2002). Synergy between extracellular modules of vascular endothelial cadherin promotes homotypic hexameric interactions. *The Journal of biological chemistry* 277, 12790-12801.
- Birdsey, G.M., Dryden, N.H., Amsellem, V., Gebhardt, F., Sahnan, K., Haskard, D.O., Dejana, E., Mason, J.C., and Randi, A.M. (2008). Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* 111, 3498-3506.
- Birukova, A.A., Birukov, K.G., Smurova, K., Adyshev, D., Kaibuchi, K., Alieva, I., Garcia, J.G., and Verin, A.D. (2004). Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. *Faseb J* 18, 1879-1890.
- Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308-1313.
- Bohil, A.B., Robertson, B.W., and Cheney, R.E. (2006). Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12411-12416.
- Bouillot, S., Tillet, E., Carmona, G., Prandini, M.H., Gauchez, A.S., Hoffmann, P., Alfaidy, N., Cand, F., and Huber, P. (2011). Protocadherin-12 Cleavage Is a Regulated Process Mediated by ADAM10 Protein: EVIDENCE OF SHEDDING UP-REGULATION IN PRE-ECLAMPSIA. *The Journal of biological chemistry* 286, 15195-15204.
- Brasch, J., Harrison, O.J., Ahlsen, G., Carnally, S.M., Henderson, R.M., Honig, B., and Shapiro, L. (2011). Structure and Binding Mechanism of Vascular Endothelial Cadherin: A Divergent Classical Cadherin. *Journal of molecular biology*.
- Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W., and Dejana, E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 87, 630-641.
- Brembeck, F.H., Rosario, M., and Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Current opinion in genetics & development* 16, 51-59.
- Brembeck, F.H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., and Birchmeier, W. (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes & development* 18, 2225-2230.
- Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1995a). Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15, 1229-1239.
- Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1995b). Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1229-1239.

- Brevier, J., Montero, D., Svitkina, T., and Riveline, D. (2008). The asymmetric self-assembly mechanism of adherens junctions: a cellular push-pull unit. *Physical biology* 5, 016005.
- Broman, M.T., Kouklis, P., Gao, X., Ramchandran, R., Neamu, R.F., Minshall, R.D., and Malik, A.B. (2006). Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circulation research* 98, 73-80.
- Broman, M.T., Mehta, D., and Malik, A.B. (2007). Cdc42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability. *Trends in cardiovascular medicine* 17, 151-156.
- Brooks, P.C., Clark, R.A., and Cheresh, D.A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264, 569-571.
- Burri, P.H., Hlushchuk, R., and Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 231, 474-488.
- Burri, P.H., and Tarek, M.R. (1990). A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 228, 35-45.
- Caduff, J.H., Fischer, L.C., and Burri, P.H. (1986). Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec* 216, 154-164.
- Calkins, C.C., Hoepner, B.L., Law, C.M., Novak, M.R., Setzer, S.V., Hatzfeld, M., and Kowalczyk, A.P. (2003). The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 278, 1774-1783.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature reviews* 11, 237-251.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* 6, 389-395.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* 9, 653-660.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuyse, B., Dewerchin, M., *et al.* (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98, 147-157.
- Cassimeris, L., and Spittle, C. (2001). Regulation of microtubule-associated proteins. *International review of cytology* 210, 163-226.
- Caveda, L., Martin-Padura, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1996). Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *The Journal of clinical investigation* 98, 886-893.

- Cavey, M., and Lecuit, T. (2009). Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a002998.
- Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P.F., and Lecuit, T. (2008). A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature* 453, 751-756.
- Chang, D.D., Park, N.H., Denny, C.T., Nelson, S.F., and Pe, M. (1998). Characterization of transformation related genes in oral cancer cells. *Oncogene* 16, 1921-1930.
- Chen, S., Maul, R.S., Kim, H.R., and Chang, D.D. (2000). Characterization of the human EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm) gene reveals distinct promoters for the two EPLIN isoforms. *Gene* 248, 69-76.
- Cherfils, J., and Pacaud, P. (2004). [Activation of G-proteins in three dimensions: one step toward the therapeutic inhibition of nucleotide exchange factors]. *Med Sci (Paris)* 20, 393-396.
- Chiasson, C.M., Wittich, K.B., Vincent, P.A., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2009). p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism. *Molecular biology of the cell* 20, 1970-1980.
- Chico, T.J., Ingham, P.W., and Crossman, D.C. (2008). Modeling cardiovascular disease in the zebrafish. *Trends in cardiovascular medicine* 18, 150-155.
- Chircop, M., Oakes, V., Graham, M.E., Ma, M.P., Smith, C.M., Robinson, P.J., and Khanna, K.K. (2009). The actin-binding and bundling protein, EPLIN, is required for cytokinesis. *Cell Cycle* 8, 757-764.
- Clark, K., Langeslag, M., Figdor, C.G., and van Leeuwen, F.N. (2007). Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends in cell biology* 17, 178-186.
- Coirault, C., Pourny, J.C., Lambert, F., and Lecarpentier, Y. (2003). [Optical tweezers in biology and medicine]. *Med Sci (Paris)* 19, 364-367.
- Comunale, F., Causeret, M., Favard, C., Cau, J., Taulet, N., Charrasse, S., and Gauthier-Rouviere, C. (2007). Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol Cell* 99, 503-517.
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M.G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., *et al.* (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9815-9820.
- Cortes, F., Debacker, C., Peault, B., and Labastie, M.C. (1999). Differential expression of KDR/VEGFR-2 and CD34 during mesoderm development of the early human embryo. *Mech Dev* 83, 161-164.
- Couffignal, T., Dufourcq, P., and Duplaa, C. (2006). Beta-catenin nuclear activation: common pathway between Wnt and growth factor signaling in vascular smooth muscle cell proliferation? *Circulation research* 99, 1287-1289.

- Cramer, L. (2008). Organelle transport: dynamic actin tracks for myosin motors. *Curr Biol* 18, R1066-1068.
- Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C.J., and Barres, B.A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 641-646.
- Daniel, J.M. (2007). Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 59-68.
- Daugherty, R.L., and Gottardi, C.J. (2007). Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda, Md* 22, 303-309.
- Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of cell biology* 163, 525-534.
- de Rooij, J., Kerstens, A., Danuser, G., Schwartz, M.A., and Waterman-Storer, C.M. (2005). Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering. *The Journal of cell biology* 171, 153-164.
- Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews* 5, 261-270.
- Dejana, E. (2010). The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circulation research* 107, 943-952.
- Dejana, E., Bazzoni, G., and Lampugnani, M.G. (1999). Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Experimental cell research* 252, 13-19.
- Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M.G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of cell science* 121, 2115-2122.
- Delanoe-Ayari, H., Al Kurdi, R., Vallade, M., Gulino-Debrac, D., and Riveline, D. (2004). Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Derycke, L.D., and Bracke, M.E. (2004). N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* 48, 463-476.
- Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Pous, C., and Perez, F. (2008). Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* 322, 1353-1356.
- Distler, J.H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R.E., Gay, S., and Distler, O. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47, 149-161.
- Djonov, V., Baum, O., and Burri, P.H. (2003). Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and tissue research* 314, 107-117.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* 78, 857-902.

Drake, C.J., and Fleming, P.A. (2000). Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* 95, 1671-1679.

Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2005). α -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin-beta-Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell* 123, 903-915.

DuFort, C.C., Paszek, M.J., and Weaver, V.M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nature reviews* 12, 308-319.

Dufour, S., Chu, Y.S., and Thiery, J.P. (2005). [From cadherins to the quantification of cell adhesion]. *Med Sci (Paris)* 21, 459-461.

Dufourcq, P., Leroux, L., Ezan, J., Descamps, B., Lamaziere, J.M., Costet, P., Basoni, C., Moreau, C., Deutsch, U., Couffignal, T., *et al.* (2008). Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation. *The American journal of pathology* 172, 37-49.

Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9, 790-803.

Dusek, R.L., Godsel, L.M., and Green, K.J. (2007). Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. *J Dermatol Sci* 45, 7-21.

Eliceiri, B.P., and Cheresch, D.A. (1999). The role of α 5 integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of clinical investigation* 103, 1227-1230.

Esser, S., Lampugnani, M.G., Corada, M., Dejana, E., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* 111 (Pt 13), 1853-1865.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

Feldman, G.J., Mullin, J.M., and Ryan, M.P. (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 883-917.

Ferber, A., Yaen, C., Sarmiento, E., and Martinez, J. (2002). An octapeptide in the juxtamembrane domain of VE-cadherin is important for p120^{cas} binding and cell proliferation. *Experimental cell research* 274, 35-44.

Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.

Flamme, I., Frolich, T., and Risau, W. (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173, 206-210.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.

- Franco, C.A., Liebner, S., and Gerhardt, H. (2009). Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel? *Current opinion in genetics & development* 19, 476-483.
- Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A., and Cheresch, D.A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270, 1500-1502.
- Fuard, D., Tzvetkova-Chevolleau, T., Decossas, S., Tracqui, P., and Schiavone, P. (2008). Optimization of poly-di-methyl-siloxane (PDMS) substrates for studying cellular adhesion and motility.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology* 123, 1777-1788.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., and Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *The Journal of cell biology* 127, 1617-1626.
- Fuxe, J., Tabruyn, S., Colton, K., Zaid, H., Adams, A., Baluk, P., Lashnits, E., Morisada, T., Le, T., O'Brien, S., *et al.* (2011). Pericyte requirement for anti-leak action of angiopoietin-1 and vascular remodeling in sustained inflammation. *The American journal of pathology* 178, 2897-2909.
- Gabison, E.E., Hoang-Xuan, T., Mauviel, A., and Menashi, S. (2003). [Metalloproteinases and angiogenesis]. *Pathol Biol (Paris)* 51, 161-166.
- Galletta, B.J., Mooren, O.L., and Cooper, J.A. (2010). Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Curr Opin Biotechnol* 21, 604-610.
- Gardner, M.K., Hunt, A.J., Goodson, H.V., and Odde, D.J. (2008). Microtubule assembly dynamics: new insights at the nanoscale. *Current opinion in cell biology* 20, 64-70.
- Gavard, J. (2009). Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett* 583, 1-6.
- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology* 8, 1223-1234.
- Gentil-dit-Maurin, A., Oun, S., Almagro, S., Bouillot, S., Courcon, M., Linnepe, R., Vestweber, D., Huber, P., and Tillet, E. (2010). Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells: a key role for p120-catenin. *Experimental cell research* 316, 2587-2599.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., *et al.* (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* 161, 1163-1177.
- Gerhardt, H., Wolburg, H., and Redies, C. (2000). N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn* 218, 472-479.

- Gerke, V., Creutz, C.E., and Moss, S.E. (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature reviews* 6, 449-461.
- Ghosh, K., Thodeti, C.K., Dudley, A.C., Mammoto, A., Klagsbrun, M., and Ingber, D.E. (2008). Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11305-11310.
- Gilbertson-Beadling, S.K., and Fisher, C. (1993). A potential role for N-cadherin in mediating endothelial cell-smooth muscle cell interactions in the rat vasculature. *Lab Invest* 69, 203-209.
- Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovic, J., Minshall, R., Neamu, R., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2005). LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 26533-26542.
- Gory-Faure, S., Prandini, M.H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M., and Huber, P. (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 126, 2093-2102.
- Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., Orsenigo, F., Cattelino, A., Kemler, R., Daniel, T.O., *et al.* (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *The Journal of cell biology* 161, 793-804.
- Green, K.J., Getsios, S., Troyanovsky, S., and Godsel, L.M. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000125.
- Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews* 6, 622-634.
- Haefliger, J.A., Nicod, P., and Meda, P. (2004). Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res* 62, 345-356.
- Halbleib, J.M., and Nelson, W.J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes & development* 20, 3199-3214.
- Han, M.Y., Kosako, H., Watanabe, T., and Hattori, S. (2007). Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase regulates actin organization and cell motility by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN. *Mol Cell Biol* 27, 8190-8204.
- Harris, E.S., and Nelson, W.J. (2010). VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Curr Opin Cell Biol* 22, 651-658.
- Harrison, O.J., Bahna, F., Katsamba, P.S., Jin, X., Brasch, J., Vendome, J., Ahlsen, G., Carroll, K.J., Price, S.R., Honig, B., *et al.* (2010).
-). Two-step adhesive binding by classical cadherins. *Nature structural & molecular biology* 17, 348-357.

- Harrison, O.J., Jin, X., Hong, S., Bahna, F., Ahlsen, G., Brasch, J., Wu, Y., Vendome, J., Felsovalyi, K., Hampton, C.M., *et al.* (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Structure* 19, 244-256.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 660-669.
- Hatanaka, K., Simons, M., and Murakami, M. (2010). Phosphorylation of VE-cadherin controls endothelial phenotypes via p120-catenin coupling and Rac1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H162-172.
- Hawkins, T., Mirigian, M., Selcuk Yasar, M., and Ross, J.L. (2010). Mechanics of microtubules. *J Biomech* 43, 23-30.
- Hayes, M.J., Rescher, U., Gerke, V., and Moss, S.E. (2004). Annexin-actin interactions. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5, 571-576.
- Hayes, M.J., Shao, D., Bailly, M., and Moss, S.E. (2006). Regulation of actin dynamics by annexin 2. *The EMBO journal* 25, 1816-1826.
- Hazan, R.B., Kang, L., Roe, S., Borgen, P.I., and Rimm, D.L. (1997). Vinculin is associated with the E-cadherin adhesion complex. *The Journal of biological chemistry* 272, 32448-32453.
- Heimark, R.L., Degner, M., and Schwartz, S.M. (1990). Identification of a Ca²⁺(+)-dependent cell-cell adhesion molecule in endothelial cells. *The Journal of cell biology* 110, 1745-1756.
- Hendrickx, M., and Leyns, L. (2008). Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. *Dev Growth Differ* 50, 229-243.
- Hermant, B., Bibert, S., Concord, E., Dublet, B., Weidenhaupt, M., Vernet, T., and Gulino-Debrac, D. (2003). Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *The Journal of biological chemistry* 278, 14002-14012.
- Hewat, E.A., Durmort, C., Jacquamet, L., Concord, E., and Gulino-Debrac, D. (2007). Architecture of the VE-cadherin hexamer. *Journal of molecular biology* 365, 744-751.
- Heyraud, S., Jaquinod, M., Durmort, C., Dambroise, E., Concord, E., Schaal, J.P., Huber, P., and Gulino-Debrac, D. (2008). Contribution of annexin 2 to the architecture of mature endothelial adherens junctions. *Mol Cell Biol* 28, 1657-1668.
- Hinck, L., Nathke, I.S., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *The Journal of cell biology* 125, 1327-1340.
- Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., and Rubin, L.L. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *Journal of cell science* 110 (Pt 14), 1603-1613.

Hirata, H., Tatsumi, H., and Sokabe, M. (2008). Zyxin emerges as a key player in the mechanotransduction at cell adhesive structures. *Communicative & integrative biology* *1*, 192-195.

Hirata, K., Ishida, T., Penta, K., Rezaee, M., Yang, E., Wohlgemuth, J., and Quertermous, T. (2001). Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* *276*, 16223-16231.

Hofmann, I., Schlechter, T., Kuhn, C., Hergt, M., and Franke, W.W. (2009). Protein p0071 - an armadillo plaque protein that characterizes a specific subtype of adherens junctions. *Journal of cell science* *122*, 21-24.

Huber, A.H., Stewart, D.B., Laurents, D.V., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *The Journal of biological chemistry* *276*, 12301-12309.

Huen, A.C., Park, J.K., Godsel, L.M., Chen, X., Bannon, L.J., Amargo, E.V., Hudson, T.Y., Mongiu, A.K., Leigh, I.M., Kelsell, D.P., *et al.* (2002). Intermediate filament-membrane attachments function synergistically with actin-dependent contacts to regulate intercellular adhesive strength. *The Journal of cell biology* *159*, 1005-1017.

Huttenlocher, A., Lakonishok, M., Kinder, M., Wu, S., Truong, T., Knudsen, K.A., and Horwitz, A.F. (1998). Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity. *The Journal of cell biology* *141*, 515-526.

Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S., and Nagafuchi, A. (1999). Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol* *144*, 1311-1322.

Ireton, R.C., Davis, M.A., van Hengel, J., Mariner, D.J., Barnes, K., Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Matrisian, L., Bundy, L.M., Sealy, L., *et al.* (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of cell biology* *159*, 465-476.

Isenberg, B.C., Dimilla, P.A., Walker, M., Kim, S., and Wong, J.Y. (2009). Vascular smooth muscle cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength. *Biophys J* *97*, 1313-1322.

Ishiyama, N., Lee, S.H., Liu, S., Li, G.Y., Smith, M.J., Reichardt, L.F., and Ikura, M. (2010). Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell* *141*, 117-128.

Iurlaro, M., Demontis, F., Corada, M., Zanetta, L., Drake, C., Gariboldi, M., Peiro, S., Cano, A., Navarro, P., Cattelino, A., *et al.* (2004). VE-cadherin expression and clustering maintain low levels of survivin in endothelial cells. *The American journal of pathology* *165*, 181-189.

Ivanov, D.B., Philippova, M.P., and Tkachuk, V.A. (2001). Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc)* *66*, 1174-1186.

Iwatsuki, H., and Suda, M. (2010). Seven kinds of intermediate filament networks in the cytoplasm of polarized cells: structure and function. *Acta histochemica et cytochemica* *43*, 19-31.

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine* 9, 685-693.

Jiang, W.G., Martin, T.A., Lewis-Russell, J.M., Douglas-Jones, A., Ye, L., and Mansel, R.E. (2008). Eplin-alpha expression in human breast cancer, the impact on cellular migration and clinical outcome. *Mol Cancer* 7, 71.

Jin, S.W., and Patterson, C. (2009). The opening act: vasculogenesis and the origins of circulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 623-629.

Jin, T., George Fantus, I., and Sun, J. (2008). Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cellular signalling* 20, 1697-1704.

Kajzar, A., Cesa, C.M., Kirchgessner, N., Hoffmann, B., and Merkel, R. (2008). Toward physiological conditions for cell analyses: forces of heart muscle cells suspended between elastic micropillars. *Biophys J* 94, 1854-1866.

Kadow, C.E., Georges, P.C., Janmey, P.A., and Beningo, K.A. (2007). Polyacrylamide hydrogels for cell mechanics: steps toward optimization and alternative uses. *Methods Cell Biol* 83, 29-46.

Kassmeyer, S., Plendl, J., Custodis, P., and Bahramsoltani, M. (2009). New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells. *Anatomia, histologia, embryologia* 38, 1-11.

Katsumi, A., Naoe, T., Matsushita, T., Kaibuchi, K., and Schwartz, M.A. (2005). Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *The Journal of biological chemistry* 280, 16546-16549.

Keating, T.J., and Borisy, G.G. (1999). Centrosomal and non-centrosomal microtubules. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 91, 321-329.

Kiener, H.P., Stipp, C.S., Allen, P.G., Higgins, J.M., and Brenner, M.B. (2006). The cadherin-11 cytoplasmic juxtamembrane domain promotes alpha-catenin turnover at adherens junctions and intercellular motility. *Mol Biol Cell* 17, 2366-2376.

Kim, S., and Coulombe, P.A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes & development* 21, 1581-1597.

Knudsen, K.A., Soler, A.P., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *The Journal of cell biology* 130, 67-77.

Ko, K.S., and McCulloch, C.A. (2001). Intercellular mechanotransduction: cellular circuits that coordinate tissue responses to mechanical loading. *Biochemical and biophysical research communications* 285, 1077-1083.

- Kobielak, A., and Fuchs, E. (2004). Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nature reviews* 5, 614-625.
- Kobielak, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol* 6, 21-30.
- Koch, A.W., Manzur, K.L., and Shan, W. (2004). Structure-based models of cadherin-mediated cell adhesion: the evolution continues. *Cell Mol Life Sci* 61, 1884-1895.
- Kovacs, E.M., and Yap, A.S. (2008). Cell-cell contact: cooperating clusters of actin and cadherin. *Curr Biol* 18, R667-R669.
- Kowalczyk, A.P., Navarro, P., Dejana, E., Bornslaeger, E.A., Green, K.J., Kopp, D.S., and Borgwardt, J.E. (1998). VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *Journal of cell science* 111 (Pt 20), 3045-3057.
- Lacaz-Vieira, F., Jaeger, M.M., Farshori, P., and Kachar, B. (1999). Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing. *J Membr Biol* 168, 289-297.
- Lal-Nag, M., and Morin, P.J. (2009). The claudins. *Genome biology* 10, 235.
- Lambert, O., Taveau, J.C., Him, J.L., Al Kurdi, R., Gulino-Debrac, D., and Brisson, A. (2005). The basic framework of VE-cadherin junctions revealed by cryo-EM. *Journal of molecular biology* 346, 1193-1196.
- Lampugnani, M.G., Orsenigo, F., Rudini, N., Maddaluno, L., Boulday, G., Chapon, F., and Dejana, E. (2010). CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *Journal of cell science* 123, 1073-1080.
- Lampugnani, M.G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L.P., and Dejana, E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *The Journal of cell biology* 118, 1511-1522.
- Lapierre, L.A. (2000). The molecular structure of the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 41, 255-264.
- Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews* 88, 489-513.
- le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *The Journal of cell biology* 189, 1107-1115.
- Lechler, T., and Fuchs, E. (2007). Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *The Journal of cell biology* 176, 147-154.
- Lecuit, T. (2010). alpha-catenin mechanosensing for adherens junctions. *Nature cell biology* 12, 522-524.

Lee, M.H., Koria, P., Qu, J., and Andreadis, S.T. (2009). JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *Faseb J* 23, 3874-3883.

Legrand, P., Bibert, S., Jaquinod, M., Ebel, C., Hewat, E., Vincent, F., Vanbelle, C., Concord, E., Vernet, T., and Gulino, D. (2001). Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca²⁺-dependent hexameric structure. *The Journal of biological chemistry* 276, 3581-3588.

Leitner, L., Shaposhnikov, D., Descot, A., Hoffmann, R., and Posern, G. (2010). Epithelial Protein Lost in Neoplasm alpha (Epln-alpha) is transcriptionally regulated by G-actin and MAL/MRTF coactivators. *Molecular cancer* 9, 60.

Li, B., Sharpe, E.E., Maupin, A.B., Teleron, A.A., Pyle, A.L., Carmeliet, P., and Young, P.P. (2006). VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 20, 1495-1497.

Liao, F., Doody, J.F., Overholser, J., Finnerty, B., Bassi, R., Wu, Y., Dejana, E., Kussie, P., Bohlen, P., and Hicklin, D.J. (2002). Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res* 62, 2567-2575.

Liebner, S., Cavallaro, U., and Dejana, E. (2006). The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1431-1438.

Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., *et al.* (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology* 183, 409-417.

Lilien, J., and Balsamo, J. (2005). The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Current opinion in cell biology* 17, 459-465.

Litvinov, R.I., Shuman, H., Bennett, J.S., and Weisel, J.W. (2002). Binding strength and activation state of single fibrinogen-integrin pairs on living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7426-7431.

Liu, Z., Sniadecki, N.J., and Chen, C.S. (2010a). Mechanical Forces in Endothelial Cells during Firm Adhesion and Early Transmigration of Human Monocytes. *Cellular and molecular bioengineering* 3, 50-59.

Liu, Z., Tan, J.L., Cohen, D.M., Yang, M.T., Sniadecki, N.J., Ruiz, S.A., Nelson, C.M., and Chen, C.S. (2010b). Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9944-9949.

Luo, Y., and Radice, G.L. (2005). N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology* 169, 29-34.

Luplertlop, N., Misse, D., Bray, D., Deleuze, V., Gonzalez, J.P., Leardkamolkarn, V., Yssel, H., and Veas, F. (2006). Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep* 7, 1176-1181.

- Maiato, H., Sampaio, P., and Sunkel, C.E. (2004). Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis. *International review of cytology* 241, 53-153.
- Mandell, K.J., and Parkos, C.A. (2005). The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 857-867.
- Marie, H., Pratt, S.J., Betson, M., Epple, H., Kittler, J.T., Meek, L., Moss, S.J., Troyanovsky, S., Attwell, D., Longmore, G.D., *et al.* (2003). The LIM protein Ajuba is recruited to cadherin-dependent cell junctions through an association with alpha-catenin. *J Biol Chem* 278, 1220-1228.
- Marsden, M., and DeSimone, D.W. (2003). Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in *Xenopus*. *Curr Biol* 13, 1182-1191.
- Martinez-Rico, C., Pincet, F., Thiery, J.P., and Dufour, S. (2010). Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. *Journal of cell science* 123, 712-722.
- Maruthamuthu, V., Sabass, B., Schwarz, U.S., and Gardel, M.L. (2011). Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4708-4713.
- Matov, A., Applegate, K., Kumar, P., Thoma, C., Krek, W., Danuser, G., and Wittmann, T. (2010). Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker. *Nature methods* 7, 761-768.
- Maul, R.S., and Chang, D.D. (1999). EPLIN, epithelial protein lost in neoplasm. *Oncogene* 18, 7838-7841.
- Maul, R.S., Sachi Gerbin, C., and Chang, D.D. (2001). Characterization of mouse epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) and comparison of mammalian and zebrafish EPLIN. *Gene* 262, 155-160.
- Maul, R.S., Song, Y., Amann, K.J., Gerbin, S.C., Pollard, T.D., and Chang, D.D. (2003). EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *J Cell Biol* 160, 399-407.
- McDonald, D.M., and Baluk, P. (2005). Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest* 128, 602S-608S.
- Medina, R., Rahner, C., Mitic, L.L., Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2000). Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. *J Membr Biol* 178, 235-247.
- Mege, R.M., Gavard, J., and Lambert, M. (2006). Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* 18, 541-548.
- Merrifield, C.J. (2004). Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends in cell biology* 14, 352-358.

- Millan, J., and Ridley, A.J. (2005). Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodelling. *The Biochemical journal* 385, 329-337.
- Minin, A.A., and Moldaver, M.V. (2008). Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochemistry (Mosc)* 73, 1453-1466.
- Miravet, S., Piedra, J., Miro, F., Itarte, E., Garcia de Herreros, A., and Dunach, M. (2002). The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *The Journal of biological chemistry* 277, 1884-1891.
- Montero-Balaguer, M., Swirsding, K., Orsenigo, F., Cotelli, F., Mione, M., and Dejana, E. (2009). Stable vascular connections and remodeling require full expression of VE-cadherin in zebrafish embryos. *PloS one* 4, e5772.
- Morishita, H., and Yagi, T. (2007). Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Current opinion in cell biology* 19, 584-592.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *The Journal of cell biology* 147, 185-194.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J.M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380, 360-364.
- Nagy, S., Ricca, B.L., Norstrom, M.F., Courson, D.S., Brawley, C.M., Smithback, P.A., and Rock, R.S. (2008). A myosin motor that selects bundled actin for motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9616-9620.
- Nagy, S., and Rock, R.S. (2010). Structured post-IQ domain governs selectivity of myosin X for fascin-actin bundles. *The Journal of biological chemistry* 285, 26608-26617.
- Nasdala, I., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Kuhn, A., Ebnet, K., Brachtendorf, G., Samulowitz, U., Kuster, B., Engelhardt, B., Vestweber, D., *et al.* (2002). A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *The Journal of biological chemistry* 277, 16294-16303.
- Navarro, P., Ruco, L., and Dejana, E. (1998). Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *The Journal of cell biology* 140, 1475-1484.
- Nelson, C.M., and Chen, C.S. (2003). VE-cadherin simultaneously stimulates and inhibits cell proliferation by altering cytoskeletal structure and tension. *Journal of cell science* 116, 3571-3581.
- Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Nieset, J.E., Redfield, A.R., Jin, F., Knudsen, K.A., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1997). Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci* 110 (Pt 8), 1013-1022.

- Niessen, C.M., Leckband, D., and Yap, A.S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiological reviews* 91, 691-731.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* 161, 653-660.
- Nogales, E., and Wang, H.W. (2006). Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Current opinion in cell biology* 18, 179-184.
- Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of molecular biology* 299, 551-572.
- Nottebaum, A.F., Cagna, G., Winderlich, M., Gamp, A.C., Linnepe, R., Polaschegg, C., Filippova, K., Lyck, R., Engelhardt, B., Kamenyeva, O., *et al.* (2008). VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *The Journal of experimental medicine* 205, 2929-2945.
- Obama, H., and Ozawa, M. (1997). Identification of the domain of alpha-catenin involved in its association with beta-catenin and plakoglobin (gamma-catenin). *The Journal of biological chemistry* 272, 11017-11020.
- Ono, S. (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *International review of cytology* 258, 1-82.
- Orr, A.W., Helmke, B.P., Blackman, B.R., and Schwartz, M.A. (2006). Mechanisms of mechanotransduction. *Developmental cell* 10, 11-20.
- Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews* 11, 633-643.
- Patel, S.D., Ciatto, C., Chen, C.P., Bahna, F., Rajebhosale, M., Arkus, N., Schieren, I., Jessell, T.M., Honig, B., Price, S.R., *et al.* (2006). Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* 124, 1255-1268.
- Pellegrin, S., and Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of cell science* 120, 3491-3499.
- Peng, X., Cuff, L.E., Lawton, C.D., and DeMali, K.A. (2009). Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to beta-catenin. *Journal of cell science* 123, 567-577.
- Petrache, I., Birukova, A., Ramirez, S.I., Garcia, J.G., and Verin, A.D. (2003). The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28, 574-581.
- Petzelbauer, P., Halama, T., and Groger, M. (2000). Endothelial adherens junctions. *J Invest Dermatol Symp Proc* 5, 10-13.
- Pirotte, S., Lamour, V., Lambert, V., Alvarez Gonzalez, M.L., Ormenese, S., Noel, A., Mottet, D., Castronovo, V., and Bellahcene, A. (2011). Dentin matrix protein 1 induces

membrane expression of VE-cadherin on endothelial cells and inhibits VEGF-induced angiogenesis by blocking VEGFR-2 phosphorylation. *Blood* 117, 2515-2526.

Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 36, 451-477.

Pollard, T.D., and Beltzner, C.C. (2002). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Current opinion in structural biology* 12, 768-774.

Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29, 545-576.

Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.

Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.

Potter, M.D., Barbero, S., and Cheresch, D.A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *The Journal of biological chemistry* 280, 31906-31912.

Prasain, N., and Stevens, T. (2009). The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular research* 77, 53-63.

Provost, E., and Rimm, D.L. (1999). Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Current opinion in cell biology* 11, 567-572.

Puech, P.H., Poole, K., Knebel, D., and Muller, D.J. (2006). A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy* 106, 637-644.

Qin, Z., Buehler, M.J., and Kreplak, L. (2010). A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *J Biomech* 43, 15-22.

Rampon, C., Bouillot, S., Climescu-Haulica, A., Prandini, M.H., Cand, F., Vandenbrouck, Y., and Huber, P. (2008). Protocadherin 12 deficiency alters morphogenesis and transcriptional profile of the placenta. *Physiological genomics* 34, 193-204.

Rampon, C., Prandini, M.H., Bouillot, S., Pointu, H., Tillet, E., Frank, R., Vernet, M., and Huber, P. (2005). Protocadherin 12 (VE-cadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast, and mesangial cells. *Experimental cell research* 302, 48-60.

Resink, T.J., Philippova, M., Joshi, M.B., Kyriakakis, E., and Erne, P. (2009). Cadherins and cardiovascular disease. *Swiss Med Wkly* 139, 122-134.

Reynolds, A.B. (2007). p120-catenin: Past and present. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 2-7.

Reynolds, A.B. (2010). Exposing p120 catenin's most intimate affair. *Cell* 141, 20-22.

- Reynolds, A.B., Daniel, J., McCrea, P.D., Wheelock, M.J., Wu, J., and Zhang, Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Molecular and cellular biology* *14*, 8333-8342.
- Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology* *16*, 522-529.
- Risau, W. (1995). Differentiation of endothelium. *FASEB J* *9*, 926-933.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular biology of the cell* *11*, 4131-4142.
- Salomon, D., Ayalon, O., Patel-King, R., Hynes, R.O., and Geiger, B. (1992). Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *Journal of cell science* *102* (Pt 1), 7-17.
- Sanders, A.J., Martin, T.A., Ye, L., Mason, M.D., and Jiang, W.G. (2011). EPLIN is a Negative Regulator of Prostate Cancer Growth and Invasion. *J Urol*.
- Sanders, A.J., Ye, L., Mason, M.D., and Jiang, W.G. (2010). The impact of EPLINalpha (Epithelial protein lost in neoplasm) on endothelial cells, angiogenesis and tumorigenesis. *Angiogenesis* *13*, 317-326.
- Sawant, D.A., Tharakan, B., Adekanbi, A., Hunter, F.A., Smythe, W.R., and Childs, E.W. (2011). Inhibition of VE-cadherin proteasomal degradation attenuates microvascular hyperpermeability. *Microcirculation* *18*, 46-55.
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C.P., Saftig, P., and Reiss, K. (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circulation research* *102*, 1192-1201.
- Schwartz, M.A. (2010). Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a005066.
- Schwartz, M.A., and DeSimone, D.W. (2008). Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Current opinion in cell biology* *20*, 551-556.
- Scott, J.A., and Yap, A.S. (2006). Cinderella no longer: alpha-catenin steps out of cadherin's shadow. *Journal of cell science* *119*, 4599-4605.
- Shapiro, L., and Weis, W.I. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *1*, a003053.
- Shasby, D.M., Ries, D.R., Shasby, S.S., and Winter, M.C. (2002). Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *American journal of physiology* *282*, L1330-1338.
- Siekmann, A.F., Covassin, L., and Lawson, N.D. (2008). Modulation of VEGF signalling output by the Notch pathway. *Bioessays* *30*, 303-313.

Simcha, I., Shtutman, M., Salomon, D., Zhurinsky, J., Sadot, E., Geiger, B., and Ben-Ze'ev, A. (1998). Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *The Journal of cell biology* *141*, 1433-1448.

Simon, A.M., and Goodenough, D.A. (1998). Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends in cell biology* *8*, 477-483.

Simon, A.M., and McWhorter, A.R. (2002). Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev Biol* *251*, 206-220.

Smutny, M., and Yap, A.S. (2010). Neighborly relations: cadherins and mechanotransduction. *J Cell Biol* *189*, 1075-1077.

Song, Y., Maul, R.S., Gerbin, C.S., and Chang, D.D. (2002). Inhibition of anchorage-independent growth of transformed NIH3T3 cells by epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) requires localization of EPLIN to actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell* *13*, 1408-1416.

Spagnuolo, R., Corada, M., Orsenigo, F., Zanetta, L., Deuschle, U., Sandy, P., Schneider, C., Drake, C.J., Breviario, F., and Dejana, E. (2004). Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood* *103*, 3005-3012.

Stehbens, S.J., Akhmanova, A., and Yap, A.S. (2009). Microtubules and cadherins: a neglected partnership. *Front Biosci* *14*, 3159-3167.

Stephanou, A., Meskaoui, G., Vailhe, B., and Tracqui, P. (2007). The rigidity in fibrin gels as a contributing factor to the dynamics of in vitro vascular cord formation. *Microvasc Res* *73*, 182-190.

Stratman, A.N., Schwindt, A.E., Malotte, K.M., and Davis, G.E. (2010). Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood* *116*, 4720-4730.

Stupack, D.G., and Chersesh, D.A. (2004). Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* *64*, 207-238.

Su, S.C., Maxwell, S.A., and Bayless, K.J. (2010). Annexin 2 regulates endothelial morphogenesis by controlling AKT activation and junctional integrity. *The Journal of biological chemistry* *285*, 40624-40634.

Suzuki, S., Sano, K., and Tanihara, H. (1991). Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell regulation* *2*, 261-270.

Suzuki, S.T. (2000). Recent progress in protocadherin research. *Experimental cell research* *261*, 13-18.

Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., and Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology* *10*, 923-934.

- Taguchi, K., Ishiuchi, T., and Takeichi, M. (2011). Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *The Journal of cell biology* 194, 643-656.
- Taveau, J.C., Dubois, M., Le Bihan, O., Trepout, S., Almagro, S., Hewat, E., Durmort, C., Heyraud, S., Gulino-Debrac, D., and Lambert, O. (2008). Structure of artificial and natural VE-cadherin-based adherens junctions. *Biochemical Society transactions* 36, 189-193.
- Telo, P., Breviario, F., Huber, P., Panzeri, C., and Dejana, E. (1998). Identification of a novel cadherin (vascular endothelial cadherin-2) located at intercellular junctions in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 17565-17572.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Thomason, H.A., Scothorn, A., McHarg, S., and Garrod, D.R. (2010). Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *The Biochemical journal* 429, 419-433.
- Tillet, E., Vittet, D., Feraud, O., Moore, R., Kemler, R., and Huber, P. (2005). N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis. *Experimental cell research* 310, 392-400.
- Toivola, D.M., Strnad, P., Habtezion, A., and Omary, M.B. (2010). Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends in cell biology* 20, 79-91.
- Tokuo, H., and Ikebe, M. (2004). Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia. *Biochemical and biophysical research communications* 319, 214-220.
- Tzima, E. (2006). Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circulation research* 98, 176-185.
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Dejana, E., Schultz, D.A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., and Schwartz, M.A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437, 426-431.
- Valiron, O., Chevrier, V., Usson, Y., Breviario, F., Job, D., and Dejana, E. (1996). Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions. *Journal of cell science* 109 (Pt 8), 2141-2149.
- van Gijn, M.E., Daemen, M.J., Smits, J.F., and Blankesteijn, W.M. (2002). The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 55, 16-24.
- van Nieuw Amerongen, G.P., Beckers, C.M., Achekar, I.D., Zeeman, S., Musters, R.J., and van Hinsbergh, V.W. (2007). Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2332-2339.
- Vartiainen, M.K. (2008). Nuclear actin dynamics--from form to function. *FEBS letters* 582, 2033-2040.
- Vernos, I. (2006). Only one spindle, if you please. *Nature cell biology* 8, 901-902.

- Vestweber, D. (2008). VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 223-232.
- Vestweber, D., Winderlich, M., Cagna, G., and Nottebaum, A.F. (2009). Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends in cell biology* 19, 8-15.
- Vincent, P.A., Xiao, K., Buckley, K.M., and Kowalczyk, A.P. (2004). VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C987-997.
- Vogel, V., and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews* 7, 265-275.
- von der Weid, P.Y., and Zawieja, D.C. (2004). Lymphatic smooth muscle: the motor unit of lymph drainage. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1147-1153.
- von Kries, J.P., Winbeck, G., Asbrand, C., Schwarz-Romond, T., Sochnikova, N., Dell'Oro, A., Behrens, J., and Birchmeier, W. (2000). Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nature structural biology* 7, 800-807.
- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., and Huber, P. (2007). Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 26, 1067-1077.
- Wallez, Y., and Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 794-809.
- Wang, N., and Ingber, D.E. (1995). Probing transmembrane mechanical coupling and cytomechanics using magnetic twisting cytometry. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 73, 327-335.
- Wang, N., Ostuni, E., Whitesides, G.M., and Ingber, D.E. (2002). Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 52, 97-106.
- Waschke, J., Curry, F.E., Adamson, R.H., and Drenckhahn, D. (2005). Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H1296-1305.
- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., and Takeichi, M. (1998a). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *The Journal of cell biology* 142, 847-857.
- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., and Takeichi, M. (1998b). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol* 142, 847-857.
- Weber, C., Fraemohs, L., and Dejana, E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7, 467-477.

- Wegmann, F., Petri, B., Khandoga, A.G., Moser, C., Khandoga, A., Volkery, S., Li, H., Nasdala, I., Brandau, O., Fassler, R., *et al.* (2006). ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *The Journal of experimental medicine* *203*, 1671-1677.
- Weksler, B.B., Subileau, E.A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., *et al.* (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J* *19*, 1872-1874.
- Wirtz, D., and Khatau, S.B. (2010). Protein filaments: Bundles from boundaries. *Nature materials* *9*, 788-790.
- Wu, Y., Jin, X., Harrison, O., Shapiro, L., Honig, B.H., and Ben-Shaul, A. (2010). Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 17592-17597.
- Xiao, K., Allison, D.F., Buckley, K.M., Kottke, M.D., Vincent, P.A., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *The Journal of cell biology* *163*, 535-545.
- Xiao, K., Garner, J., Buckley, K.M., Vincent, P.A., Chiasson, C.M., Dejana, E., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2005). p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Molecular biology of the cell* *16*, 5141-5151.
- Yamada, A., Irie, K., Hirota, T., Ooshio, T., Fukuhara, A., and Takai, Y. (2005a). Involvement of the annexin II-S100A10 complex in the formation of E-cadherin-based adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of biological chemistry* *280*, 6016-6027.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., and Nelson, W.J. (2005b). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* *123*, 889-901.
- Yang, S., Graham, J., Kahn, J.W., Schwartz, E.A., and Gerritsen, M.E. (1999). Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *The American journal of pathology* *155*, 887-895.
- Yano, H., Mazaki, Y., Kurokawa, K., Hanks, S.K., Matsuda, M., and Sabe, H. (2004). Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *The Journal of cell biology* *166*, 283-295.
- Yarmola, E.G., and Bubb, M.R. (2009). How depolymerization can promote polymerization: the case of actin and profilin. *Bioessays* *31*, 1150-1160.
- Yeh, H.I., Lai, Y.J., Chang, H.M., Ko, Y.S., Severs, N.J., and Tsai, C.H. (2000). Multiple connexin expression in regenerating arterial endothelial gap junctions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *20*, 1753-1762.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010). alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol* *12*, 533-542.

- Zanetti, A., Lampugnani, M.G., Balconi, G., Breviario, F., Corada, M., Lanfranccone, L., and Dejana, E. (2002). Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 617-622.
- Zhang, H., Berg, J.S., Li, Z., Wang, Y., Lang, P., Sousa, A.D., Bhaskar, A., Cheney, R.E., and Stromblad, S. (2004). Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nature cell biology* 6, 523-531.
- Zhang, J., O'Donnell, J.J., 3rd, Holian, O., Vincent, P.A., Kim, K.S., and Lum, H. (2010). P120 catenin represses transcriptional activity through Kaiso in endothelial cells. *Microvascular research* 80, 233-239.
- Zhang, S., Wang, X., Osunkoya, A.O., Iqbal, S., Wang, Y., Chen, Z., Muller, S., Jossion, S., Coleman, I.M., Nelson, P.S., *et al.* (2011). EPLIN downregulation promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells and correlates with clinical lymph node metastasis. *Oncogene*.
- Zheng, Q., and Zhao, Y. (2007). The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biol Cell* 99, 489-502.
- Zhou, X., Stuart, A., Dettin, L.E., Rodriguez, G., Hoel, B., and Gallicano, G.I. (2004). Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture. *Journal of cell science* 117, 3129-3140.
- Zhou, Y., Fisher, S.J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., and Damsky, C.H. (1997). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *The Journal of clinical investigation* 99, 2139-2151.
- Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. (2000). Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *Journal of cell science* 113 (Pt 18), 3127-3139.
- Zigmond, S. (2004). Formin' adherens junctions. *Nature cell biology* 6, 12-14.

The Motor Protein Myosin-X Transports VE-Cadherin along Filopodia To Allow the Formation of Early Endothelial Cell-Cell Contacts^{∇†}

Sébastien Almagro,^{1,2,3‡} Claire Durmort,^{3,4‡} Adeline Chervin-Pétinot,^{1,2,3‡} Stephanie Heyraud,^{1,2,3,4‡} Mathilde Dubois,^{6‡} Olivier Lambert,^{6‡} Camille Maillefaud,^{3,4} Elizabeth Hewat,^{5‡} Jean Patrick Schaal,^{7‡} Philippe Huber,^{1,2,3‡} and Danielle Gulino-Debrac^{1,2,3,4‡*}

Laboratoire de Physiopathologie Vasculaire, CEA, 38054 Grenoble, France¹; INSERM U882, 38054 Grenoble, France²; Université Joseph Fourier, Grenoble, France³; Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules⁴ and Laboratoire de Microscopie Electronique Structurale,⁵ Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel UMR CNRS 5075, Grenoble, France; CBMN UMR CNRS 5248-Institut Européen de Chimie et de Biologie, Université Bordeaux 1, Talence, France⁶; and Département de Gynécologie Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire Michallon, Grenoble, France⁷

Received 14 September 2009/Returned for modification 6 November 2009/Accepted 22 January 2010

Vascular endothelium (VE), the monolayer of endothelial cells that lines the vascular tree, undergoes damage at the basis of some vascular diseases. Its integrity is maintained by VE-cadherin, an adhesive receptor localized at cell-cell junctions. Here, we show that VE-cadherin is also located at the tip and along filopodia in sparse or subconfluent endothelial cells. We observed that VE-cadherin navigates along intrafilopodial actin filaments. We found that the actin motor protein myosin-X is colocalized and moves synchronously with filopodial VE-cadherin. Immunoprecipitation and pulldown assays confirmed that myosin-X is directly associated with the VE-cadherin complex. Furthermore, expression of a dominant-negative mutant of myosin-X revealed that myosin-X is required for VE-cadherin export to cell edges and filopodia. These features indicate that myosin-X establishes a link between the actin cytoskeleton and VE-cadherin, thereby allowing VE-cadherin transportation along intrafilopodial actin cables. In conclusion, we propose that VE-cadherin trafficking along filopodia using myosin-X motor protein is a prerequisite for cell-cell junction formation. This mechanism may have functional consequences for endothelium repair in pathological settings.

The endothelium is composed of a monolayer of endothelial cells that lines the vascular tree. Hemodynamic forces, immune-mediated mechanisms, or drug ingestion can injure the endothelium (35). These types of damage are frequently accompanied by a loss of endothelium integrity, an increase in vascular permeability, and possibly by a detachment of endothelial cells from vascular walls (14). These alterations can be circumvented by initiating rapid repair mechanisms that reestablish endothelium integrity and consequently reduce the extent of vascular diseases. The molecular mechanisms at the basis of the endothelium repair process remain elusive, but it can be assumed that the reconstitution of endothelium integrity requires cell-cell junction rebuilding.

In the endothelium, intercellular adherence is maintained by tight and adherens junctions. Adherens junctions are particularly crucial in controlling the formation and maintenance of interendothelial adhesion and constitute dynamic structures

that undergo remodeling in migrating as well as resting cells (31). They are essentially composed of vascular endothelial-cadherin (VE-Cad) (22), an adhesive receptor able to elaborate homophilic/homotypic interactions via its extracellular domain and to recruit, through its cytoplasmic tail, partners such as α -, β -, and γ -catenins and p120 (1). Catenins, in turn, promote the association of the adherens junction with the actin cytoskeleton, another player regulating vascular endothelial barrier function, by molecular mechanisms that are incompletely defined (8). Although there is a general agreement about the critical role played by actin filaments in the maintenance of mature cell-cell junctions (27, 41), their precise role in the elaboration of premature adherens junctions is poorly understood. Some studies indicate that cells form intercellular junctions by a dynamic process driven by actin polymerization (38). It was proposed but, to our knowledge not firmly demonstrated, that cell-cell junction formation is initiated by the production of filopodia emanating from neighboring cells (3, 30, 39, 42). Filopodia lead to the elaboration of puncta, which correspond to microdomains where cadherin molecules concentrate together with their intracellular partners (3). These puncta spatially coincide with cell membrane attachment sites for actin filaments (2). The mechanism by which puncta are elaborated remains to be elucidated.

Filopodia are highly dynamic structures filled with bundles of linear actin filaments (15). Their protrusion is driven by actin polymerization taking place at filament barbed ends that are mainly located at filopodium tips (24). The precise mechanisms of the nucleation and elongation of filopodia are con-

* Corresponding author. Mailing address: iRTSV, APV, INSERM U882, CEA-Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Phone: 33 4 38 78 92 72. Fax: 33 4 38 78 49 64. E-mail: danielle.gulino@cea.fr.

‡ S.A. generated Fig. 1, 3, and 4, as well as Fig. 7 to 15 and all movies. C.D. and S.H. generated Fig. 5. A.C.-P. generated Fig. 2, and O.L. and M.D. generated Fig. 6. J.P.S. provided human umbilical cords. P.H. is the head of the laboratory and provided grants, equipment, and discussions, whereas E.H. helped write this article. D.G.-D. conceived experiments, interpreted data, and wrote the article.

† Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

[∇] Published ahead of print on 1 February 2010.

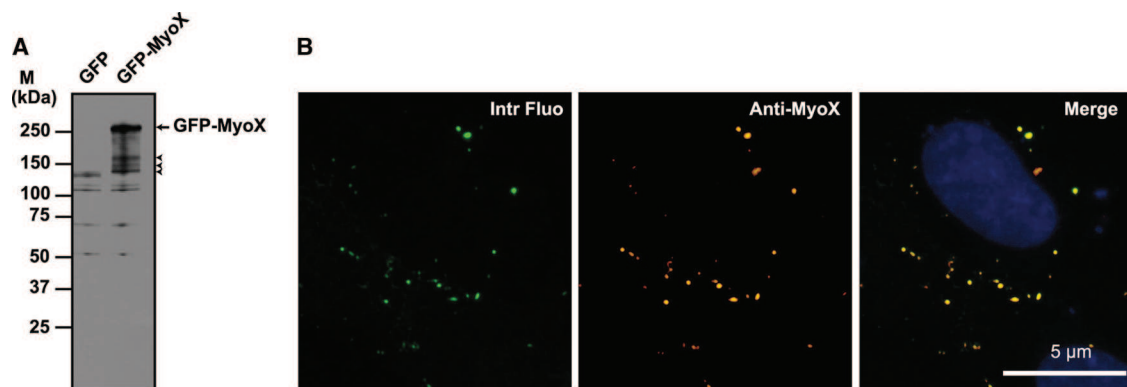


FIG. 1. Biochemical characterization of the anti-MyoX antibody. (A) The rabbit polyclonal anti-myosin-X antibody identified a polypeptide band of the expected molecular mass in lysates of GFP-MyoX-expressing CHO cells. In contrast, no specific band was detected in lysates of GFP-expressing CHO cells, indicating that no MyoX is expressed in CHO cells. The arrow points out intact GFP-MyoX, whereas arrowheads indicate degradation products. M, molecular mass markers. (B) CHO cells expressing GFP-MyoX were immunofluorescently stained for MyoX. We observed that the intrinsic fluorescence of the GFP tag (Intr Fluo) colocalized with the immunostaining of MyoX (Anti-MyoX), thus attesting to the specificity of the antibody for MyoX.

troversial. In fact, two mechanisms for their formation have been proposed, each using different sets of actin-regulating proteins. According to the “convergent elongation model,” filopodia are continuously initiated by the elongation of pre-existing lamellipodial actin filaments (34). This remodeling of actin filaments should require the branching activity of Arp2/3 (29), the F-actin-bundling activity of fascin along filopodium shafts and the anticapping activity of Ena/VASP at the barbed ends of actin filaments (4). In the opposing model, it was proposed that some members of the formin family such as Dia2 perform all these activities (17). Indeed, *in vitro*, Dia2 nucleates linear actin filaments, accelerates actin polymerization, and protects barbed ends from capping proteins, thus slowing actin depolymerization (7, 17). Additionally, new players such as myosin-X (MyoX), able to induce filopodium formation, have been recently discovered.

Here, using cryo-electron microscopy (cryo-EM), we show that VE-cadherin is not exclusively located at cell-cell junctions but is also present along and at the tip of filopodia in sparse endothelial cells. By video microscopy, we observed that VE-cadherin migrates along filopodia in forward and backward movements. We hypothesized that motor proteins of the myosin family may be involved in the VE-cadherin transportation along filopodia. We considered MyoX as a potential candidate for promoting VE-cadherin trafficking.

Myosins participate in a range of diverse cellular processes such as cell migration, membrane trafficking, and formation of cellular protrusions. They share conserved structural features such as a motor domain located at their N termini that can bind to actin filaments and hydrolyze ATP to produce movement and force. At their C termini, members of the unconventional myosin family such as myosin-VII, -X, -XII, and -XV exhibit a myosin tail homology 4 domain (MyTH4) followed by a FERM (band 4.1 protein, ezrin, radixin, and moesin) domain that confers upon them with the ability to perform unique cellular functions (6). A fascinating feature of MyoX is that it uses its motor activity to move along the intrafilopodial actin filaments. This probably allows MyoX to carry cargoes along filopodia. Potential cargoes are the β -chains of integrins, re-

cently reported to directly interact with the FERM domain of MyoX (43), and Mena/VASP, which is synchronously transported with MyoX toward the tip or the base of filopodia (36). In addition to its motor and transport functions, MyoX also promotes the formation of filopodia (5, 9, 37). Hence, MyoX overexpression stimulates filopodium growth (5), whereas its knockdown decreases filopodium formation (9, 28, 37).

Herein, we discovered that MyoX is colocalized with VE-cadherin in filopodia and moves synchronously with it. Using immunoprecipitation (IP) experiments and pulldown assays, we demonstrated that MyoX interacts with the VE-Cad-catenin complex. Our data thus support a role of MyoX in the transportation of VE-cadherin along intrafilopodial actin. The forward MyoX-mediated transport facilitates the accumulation of VE-Cad at the tips of filopodia, where VE-Cad can interact with partners of adjacent cells, thus establishing preliminary cell-cell contacts. Formation of these early cell-cell contacts can be inhibited by blocking MyoX transport capacity. At filopodium tips, VE-Cad linked to MyoX, but not engaged in homophilic interactions, may also be transported backwards to the cell body by the actin retrograde flow. Once at the lamellipodium edge, VE-Cad can be picked up again by newly formed filopodia. Our data suggest that MyoX-mediated transport of the VE-Cad-catenin complex along filopodia is a key event required for the early steps of formation of cell-cell contacts, a process that may be of functional importance in endothelium repair and angiogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Drugs and antibodies. Fibronectin, latrunculin B (LaB), fluorescein isothiocyanate (FITC)- or rhodamine-conjugated phalloidin, and monoclonal antibody (MAb) against α -catenin and β -actin were from Sigma-Aldrich. The MAb antibodies against β - and γ -catenins and p120 were from Transduction Laboratories. The affinity-purified polyclonal antibody (pAb) against human MyoX from SDI (Newark, DE) was used in Western blot, immunoprecipitation, and immunofluorescence analyses. Its biochemical characterization is presented in Fig. 1. The pAb anti- β 1 integrin antibody was a generous gift from C. Albigès-Rizo (25), while the anti-glutathione S-transferase (anti-GST) pAb was from GE Healthcare. The anti-Cad3 pAb was used to immunoprecipitate the VE-Cad-based complex (18); (19). The anti-VE-Cad pAb C-19 (Santa Cruz Biotechnology) and

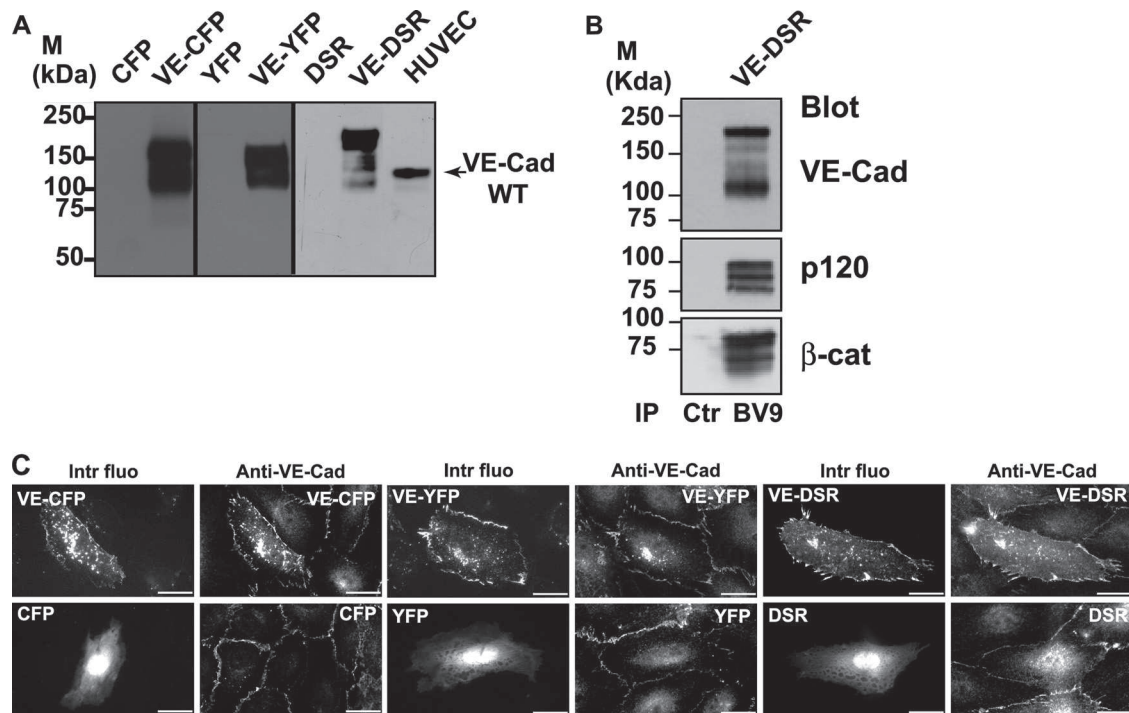


FIG. 2. Characterization of the fluorescent proteins VE-CFP, VE-YFP, and VE-DSR. (A) Biochemical characterization of VE-CFP, VE-YFP, and VE-DSR. cDNA constructs expressing CFP, VE-CFP, YFP, VE-YFP, DSR, and VE-DSR were transfected in CHO cells. At 24 h posttransfection, lysates of these transfected cells were analyzed by Western blotting. The anti-VE-Cad MAb BV9 identified polypeptide bands of 165, 150, and 190 kDa corresponding to the expected sizes for VE-CFP, VE-YFP and VE-DSR, respectively. These bands were not detected in lysates of CHO cells expressing CFP, YFP, and DSR. In HUVECs used as a control, the wild-type (WT) form of VE-Cad was detected as a 135-kDa polypeptide band. (B) Coimmunoprecipitation of VE-DSR with catenins. Anti-VE-Cad immunoprecipitation (IP BV9) was performed on VE-DSR-expressing CHO cells prior to being resolved on a 4 to 12% gradient gel, electrotransferred, and probed successively for VE-Cad, p120, and β-catenin (β-cat). As control, an immunoprecipitation performed on VE-DSR-expressing CHO cells using rabbit nonimmune IgG (Ctr) was analyzed in parallel. Molecular mass markers (M) are given at the margin of the panel. (C) Localization at cell-cell contacts of exogenous VE-CFP, VE-YFP, and VE-DSR transiently expressed in HUVECs. HUVECs expressing VE-CFP, CFP, VE-YFP, YFP, VE-DSR, and DSR were immunofluorescently stained for VE-Cad and observed by confocal microscopy. Then, the intrinsic fluorescence of the CFP, YFP, and DSR tags (Intr fluo) was compared to the immunofluorescent staining (Anti-VE-Cad). As expected, the three fluorescent VE-Cad proteins were mainly expressed at cell-cell junctions and on filopodia recapitulating the staining pattern of endogenous VE-Cad. In contrast, the proteins CFP, YFP, and DSR did not present a specific localization. Bars, 20 μm.

MAb BV9 (11) (Abcam) were used in Western blot experiments. The monoclonal antibody (MAb) BV9 is directed against the extracellular domain and the polyclonal antibody (pAb) C-19 against the 19-amino-acid peptide at the VE-Cad C terminus. The secondary Cy2- or Cy3-conjugated antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, the Cy5-conjugated antibodies were from GE Healthcare, and Alexa 488, 555, and 633 were purchased from Invitrogen.

Cell culture. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated and cultured as previously described (16). Only cells on passage 2 were used. HeLa cells and CHO cells were respectively cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) or in minimal essential medium alpha (α-MEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics.

cDNA constructs and protein expression in *E. coli*. A cDNA fragment containing the sequence encoding the FERM domain of bovine MyoX (K1767 to V2051) (6) was produced by PCR using the oligonucleotides 5'-GTGGATCCA AGTTTGAAAAGCTGGCCGCC-3' (forward) and 5'-TCGACCCGGGTCAC ACGGAGCGCGAGGTGCTGTA-3' (reverse). After digestion with BamHI and XmaI, the PCR fragment was then inserted into pGEX-4T1 (GE Healthcare) to elaborate the vector pGEX-4T1-FERM coding for the FERM domain of MyoX fused with an N-terminus GST (GST-FERM). The protein GST-FERM was then produced in BL21-RIL (Stratagene) and purified from inclusion bodies dissolved in urea. The protein was *in vitro* refolded by rapid dilution in 50 mM Tris-HCl (pH 8) buffer containing 150 mM NaCl prior to being captured on a glutathione-Sepharose column. The 59-kDa recombinant protein was purified

to homogeneity after elution using reduced glutathione. The His-tagged cytoplasmic domain of VE-Cad was obtained as previously described (40).

Eukaryotic expression vectors. The vector encoding green fluorescent protein (GFP)-MyoX was kindly provided R. Cheney (5). Pro-VE-Cad cDNA was subcloned in the Clontech vectors pAmCyan1-N1 and pZsYellow1-N1 to express VE-Cad C-terminally fused with cyan fluorescent protein (VE-CFP) and yellow fluorescent protein (VE-YFP). Additionally, Pro-VE-Cad was also C-terminally fused with the tandem dimer of DsRed, tdimer2, using the vector pcDNA3.1-DsRed previously described (12). This protein, designated VE-DSR, remained monomeric because of its fusion with a tandem dimer of DsRed. Indeed, formation of intramolecular contacts between the tandem DsRed moieties within the same polypeptide prevents protein oligomerization (12). Additionally, the tandem DsRed motif rendered VE-DSR resistant to photobleaching and consequently perfectly well-adapted to video microscopy experiments. The characterization of these fluorescent proteins is presented in Fig. 2. The specificity of VE-DSR and GFP-MyoX localization in double-fluorescently transfected HUVECs was also controlled (Fig. 3).

To express in HUVECs and CHO cells the protein GST-FERM-DSR, the eukaryotic expression vector pcDNA3.1-GST-FERM-DSR was constructed by amplifying by PCR the cDNA coding for the GST-FERM protein. This was performed using the *Escherichia coli* expression vector pGEX-4T1-FERM and the primers 5'-CACATCTAGAATGTCCCTATAGGTTAT-3' and 5'-G CAGATATCACGGAGCGCGAGGT-3'. Following digestion by XbaI and EcoRV, this PCR fragment was then introduced in the vector pcDNA 3.1-DSRed to generate the eukaryotic expression vector pcDNA-GST-FERM-DSR,

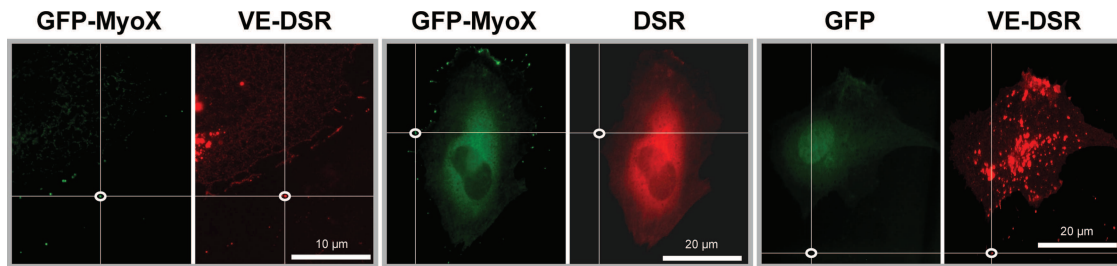


FIG. 3. Specificity of localization of VE-DSR and GFP-MyoX in double-fluorescently transfected HUVECs. To control the specificity of GFP-MyoX localization, HUVECs coexpressing either GFP-MyoX and VE-DSR (panels at left) or GFP-MyoX and DSR (middle panels) were analyzed in green and red fluorescence channels. Using ImageJ, the fluorescent intensities (I) of GFP-MyoX spots (delimited by ellipses) were measured and compared to the fluorescent intensities of the superimposed areas in the other channel. While the mean value for the $I_{\text{GFP-MyoX}}/I_{\text{VE-DSR}}$ ratio ranges around 1 (20 measurements from 5 images), that of the $I_{\text{GFP-MyoX}}/I_{\text{DSR}}$ ratio varied between 3×10^5 and infinite (20 measurements from 5 images). Similarly, to control the specificity of VE-DSR localization, HUVECs coexpressing GFP and VE-DSR were analyzed in parallel for fluorescent localization (panels at right). While the mean value for the $I_{\text{VE-DSR}}/I_{\text{GFP}}$ ratio ranges around 1, that of the $I_{\text{VE-DSR}}/I_{\text{GFP}}$ ratio varied between 1×10^5 and infinite (20 measurements from 5 images). From ratio-metric quantification, it can be deduced that the localization of VE-DSR or GFP-MyoX is not disturbed by GFP- and DSR-associated fluorescence, respectively.

coding for GST-FERM-DSR. Similarly, to express in HUVECs and CHO cells, the protein GST-DSR, the eukaryotic expression vector pcDNA-GST-DSR was elaborated by amplifying the cDNA coding for GST. This was made using the vector pGEX-4T1 (GE-Healthcare) and the primers 5'-CCGCTCGAGATGTC CCCTATACTAGGTTATTG-3' and 5'-GCGGATCCTTATCCGATTTTGGG GGATGGTC-3'. Following digestion by XhoI and BamHI, this fragment was inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA-DSRed to generate the vector pcDNA-GST-DSR coding for GST-DSR.

Transfections. Once seeded on glass coverslips or Labtek I (Nunc, Rochester, NY), HUVECs were transiently transfected using 200 nM polyethylenimine (PEI; Sigma-Aldrich) added in cell medium culture devoid of serum during 45 min at 37°C. HeLa and CHO cells were transfected using Exgen 500 (Euromedex) according to the manufacturer's protocol.

Immunoprecipitation and GST pulldown assays. For pulldown assays, cell lysates (57 cm²) were incubated overnight at 4°C with 200 μ l of glutathione beads coupled to either GST or GST-FERM proteins in the presence or absence of 100 μ M latrunculin B (LaB). After three washing steps in lysis buffer, consisting of 10 mM PIPES [piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid), pH 7.7], containing 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 0.5% NP-40, pulled-down proteins were eluted with 100 μ l washing buffer containing 20 mM reduced glutathione and then boiled with Laemmli buffer containing β -mercaptoethanol.

For immunoprecipitations, endothelial cell or CHO monolayers (57 cm²) were lysed for 5 min at 4°C and scrapped in 500 μ l radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (phosphate-buffered saline [PBS], pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5% deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM ATP, containing a protease inhibitor cocktail). Prior to preclearing, cell lysates were treated with latrunculin B as mentioned for pulled-down experiments. Precleared lysates were immunoprecipitated with the polyclonal anti-MyoX (4 μ g) or anti-VE-Cad (4 μ g) antibodies coupled to 1.6 mg of protein A-Sepharose (Sigma). Immune complexes were washed three times with RIPA buffer prior to being eluted with 2 \times Laemmli buffer for 10 min at 100°C and reduced with β -mercaptoethanol.

SDS-PAGE and Western blot analysis. MyoX immunoprecipitations were separated by electrophoresis in MOPS (morpholinepropanesulfonic acid) buffer (Bio-Rad) on precast Criterion XT 4 to 12% gradient Bis-Tris gels (Bio-Rad). The gels were transferred 1 h (300 mA) to Immobilon membrane (Millipore) using a Tris-glycine buffer. Then, membranes were blocked with 5% nonfat dry milk, and proteins from total cell extracts, immunoprecipitates, or pulldown assays were detected by specific primary antibodies as specified followed by horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit immunoglobulin reagents (Sigma). The immunoreactive bands were revealed using the ECL enhanced chemiluminescence Western blot detection kit (Amersham).

Immunofluorescence labeling of fixed HUVECs. For all immunostainings except MyoX, cells were fixed for 20 min with 3% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized using 0.5% Triton X-100 for 3 min. The protocol to visualize MyoX is adapted from reference 23. Briefly, after two rinsing steps in calcium- and magnesium-containing PBS, cells kept for 3 min on ice were prepermeabilized for 3 min in MyoX-F buffer (10 mM PIPES, pH 6.8, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose) with 0.5% Triton X-100 containing an inhibitor cocktail (Roche) prior to being fixed for 20 min at room temperature with chilled

MyoX-F buffer containing 4% PFA. After a blocking step in 5% fetal calf serum-containing PBS during 1 h, cells were incubated with primary antibodies overnight at 4°C and subsequently incubated with appropriate secondary antibodies.

Microscopy. For video microscopy experiments, once seeded on Lab-Tek I chambers, HUVECs and HeLa cells were maintained in phenol red-deprived M199 (supplemented with low serum growth supplement, 20% fetal calf serum, and antibiotics) and phenol red-deprived DMEM (supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics) cell culture media, respectively. Confocal video microscopy images were collected on a Zeiss LSM510 confocal microscope equipped with a heating workplate, a humidifier, a CO₂ delivery system, and using either a $\times 63$ Plan Apochromat objective (oil, 1.45 numerical aperture [NA], pH 3) or a $\times 40$ Plan-Neofluar objective (oil, 1.30 NA, pH 3) (photonic microscopy-cellular imaging platform of Institut Albert Bonniot, Grenoble, France). The time between images was typically 1 to 3 min. Phase-contrast images were always coacquired with YFP in order to reduce the delay between frames. Epifluorescence video microscopy images were collected sequentially on an IX71 (Olympus) microscope equipped with a heating workplate, a humidifier, and a CO₂ delivery system and using a $\times 40$ Plan Apochromat (oil, 1.0 NA, pH 3) or a $\times 40$ UApochromat (oil, 1.35 NA) objective and an ORCA-ER camera (Hamamatsu). Typical time between frames for epifluorescence videomicroscopy varies from 100 ms to 3 min. In general, cells were imaged over periods of 1 to 180 min. Confocal images on fixed cells were collected sequentially using a Leica TCS-SP2 confocal microscope (Leica Mannheim, Germany) equipped with a $\times 63$ HCX Plan Apochromat objective (oil, 1.4 NA). Epifluorescence images on fixed cells were acquired using an Axioplan 2 microscope (Zeiss) equipped with a $\times 100$ AchromPlan (oil, 1.25 NA) or $\times 50$ AchromPlan (oil, 0.9 NA) and an Axiocam MR camera. Fluorescence filters were chosen and tested on each combination of plasmid constructions to abolish fluorescence overlap. Only microscope proprietary software was used to acquire images.

Image processing. Each time-lapse confocal image corresponds to the projection of four 500-nm optical sections. Movies were treated and edited using ImageJ and Adobe After Effects 6.5 and exported using Quick Time Pro 7.4 with H.264 codec. For fixed cells, images were treated and mounted using Adobe Photoshop CS 2 and Illustrator CS 2.

Patch velocity measurements and statistics. Kymographs were generated using ImageJ and Multiple kymograph plugin. In fact, kymographs were generated by analyzing several filopodia from different HeLa cells. Two typical kymographs illustrating the forward (A) and backward (B) movements of GFP-MyoX are shown in Fig. 4. The two-sample t test was used to determine if the average rates for forward movements of VE-DSR and GFP-MyoX, derived from velocity histograms, were equivalent.

Cryo-electron microscopy. HUVECs were plated on holey carbon fibronectin-precoated nickel grids. After a 24-h postseeding period, cells were fixed with paraformaldehyde at room temperature. VE-Cad was then stained with the monoclonal antibody BV9 and protein A conjugated to 10-nm colloidal gold particles. Cells were submitted to a postfixation step using glutaraldehyde. For cryo-EM observation of VE-Cad, grids were rapidly plunged into a liquid ethane bath cooled with liquid nitrogen (Leica EM CPC, Vienna, Austria) and maintained at a temperature of approximately -170°C using a cryo-holder (Gatan,

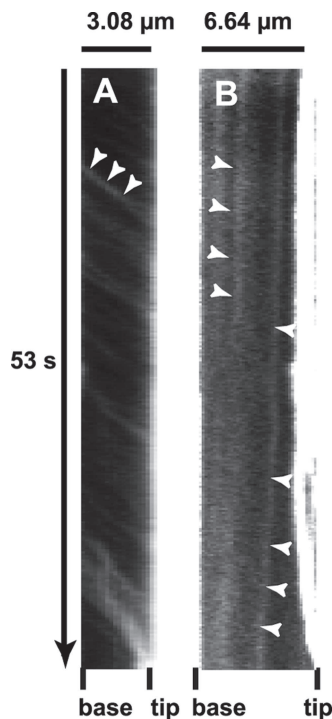


FIG. 4. Kymographs illustrating the forward and backward movements of GFP-MyoX. (A) Kymograph of a selected filopodium emanating from GFP-MyoX-expressing HeLa cells imaged at 25°C using a $\times 40$ lens (NA 1.35), a pixel size of 162 nm, and a frame rate of 5.6 images s^{-1} over 300 frames. Numerous faint tracks sloped down toward the filopodium tip, illustrating the forward movement of GFP-MyoX. Note that patches of GFP-MyoX move at a relatively similar constant velocity. (B) Kymograph of a selected filopodium emanating from a GFP-MyoX-expressing HeLa cell imaged as in Fig. 4A. Two faint tracks sloped down toward the filopodium base, illustrating the backward movement of MyoX.

Pleasanton, CA) prior to being observed using an FEI Tecnai F20 electron microscope (Eindhoven, Netherlands) operating at 200 kV under low-dose conditions. Images were recorded with a 2,000-by-2,000 low-scan charge-coupled device (CCD) camera (Gatan).

RESULTS

Filopodia establish the preliminary endothelial cell-cell contacts. To elucidate the role of filopodia in the formation of early endothelial cell-cell contacts, HUVEC monolayers were costained for VE-cadherin and actin. As expected, costaining revealed that the most mature junctions exhibited a continuous thin VE-Cad labeling close to circumferential actin cables (Fig. 5, middle and upper panels). However, in preliminary cell-cell contacts, VE-Cad labeling exhibited a characteristic zigzag staining dotted with residual randomly distributed intercellular gaps (Fig. 5, middle and lower panels). These newly formed intercellular contacts were composed of multiple protrusions where VE-Cad colocalized with radially oriented actin fibers (Fig. 5, lower panels). Cryo-electron microscopy confirmed and showed more precisely that, in subconfluent HUVECs, VE-Cad molecules are distributed along and at the tips of protrusions. The electron micrographs also revealed the presence of actin filaments aligned in tight parallel bundles within

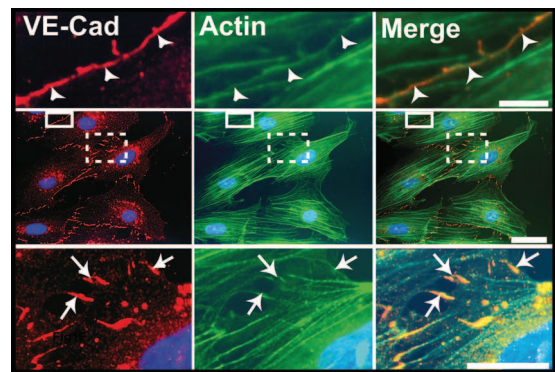


FIG. 5. Localization of VE-Cad in subconfluent HUVECs. Images in the central row show a HUVEC monolayer immunolabeled for VE-Cad (red, left) and actin (green, center), as well as the merge (right). The selected enlargements of a mature cell-cell junction (continuous frame) and an immature junction (dotted frame) are shown in the upper and lower rows, respectively. In mature junctions, VE-Cad and cortical actin fibers are located at the cell circumference (arrowheads, upper row). In contrast, in immature junctions, VE-Cad colocalizes with radial actin fibers along filopodial extensions bridging adjacent cells (arrows, lower row). Bars: 2 μm , upper; 10 μm , middle; and 5 μm , lower.

these protrusions that, consequently, could be functionally defined as filopodia (Fig. 6) (34).

VE-Cad molecules navigate on filopodia. We then used video microscopy to examine whether VE-Cad is able to move along filopodia. To visualize VE-Cad, various constructs coding for VE-Cad C-terminally fused to fluorescent DsRed (red), YFP (yellow), and CFP (cyan) were elaborated to express VE-DSR, VE-YFP, or VE-CFP, respectively (Fig. 2). It must be noted that these cDNA constructs were designed to produce fluorescent VE-Cad molecules that remained monomeric and interact with catenins (reported in Materials and Methods; Fig. 2).

At subconfluency, HUVECs emitted numerous filopodia that formed bridges between neighboring cells (Fig. 5). In preliminary confocal video microscopy experiments performed on VE-YFP-expressing HUVECs, at a frame rate of 1 image min^{-1} , we observed that some patches of VE-YFP adopted linear trajectories by moving along preestablished filopodia (Fig. 7; see Movie S1 in the supplemental material). In contrast, no such movement was seen for YFP (Fig. 7; see Movie S2 in the supplemental material). In a second type of experiments, sparse living HUVECs transiently expressing VE-DSR were observed by video microscopy using a frame rate of 3 images s^{-1} (see Movie S3 in the supplemental material). Under these conditions, isolated cells emitted numerous free filopodia along which faint VE-DSR particles moved rapidly. VE-DSR trajectories appeared nearly linear and were more rapid in Movie S3 than those observed by slow-frame-rate confocal video microscopy in Movie S1. In contrast, such a rapid traffic was not observed in HUVECs overexpressing control DSR (see Movie S4 in the supplemental material), thereby indicating that trafficking is due to the VE-Cad moiety linked to the transportation machinery. Altogether, the data suggest that VE-Cad molecules navigate on filopodia, probably through an actin-dependent mechanism excluding the possibility that membrane diffusion is at the basis of VE-Cad motion.

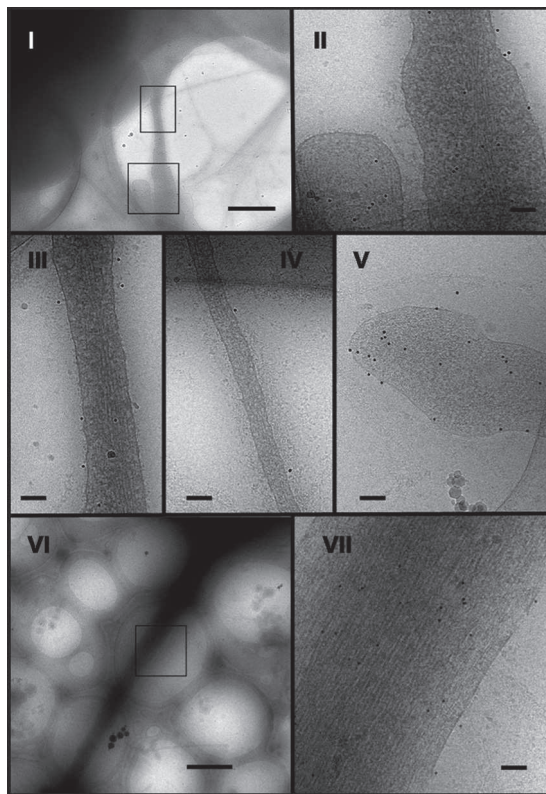


FIG. 6. Localization of VE-Cad at the surface of HUVEC filopodia by electron microscopy. Living HUVECs were seeded on electron microscopy holey grids and grown for 24 h. After fixation without permeabilization, cells were successively marked with MAb BV9 antibody and protein A-conjugated gold particles to reveal the presence of VE-Cad at the cell surface. They were then vitrified for observation. Electron micrographs revealed filopodia of various diameters and lengths connecting adjacent cells (micrographs I and VI, bars, 1 μ m). Higher-magnification images show gold particles dispersed along the length (micrographs II, III, IV, and VII, bars, 100 nm) and at the tip of filopodia (micrograph V, bar, 100 nm). This indicates that VE-Cad is distributed over the surface of filopodia. Furthermore, on large as well as thin filopodia, underneath the plasma membrane, the network of actin fibers could be observed parallel to the filopodium axis (micrograph VII).

Moreover, as shown thereafter, the fast and slow velocities observed for VE-Cad particles corresponded to forward (toward the filopodium tip) and backward (toward the filopodium basis) motions, respectively.

The motor protein myosin-X interacts with the VE-Cad-catenin complex. As VE-Cad is able to move along filopodia, we hypothesized that VE-Cad is directly or indirectly linked to intrafilopodial actin fibers through an actin motor protein. Myosins constitute a family of actin-dependent motor proteins that support protein carrier function. Endothelial cells expressed several myosin family members such as myosin-II, -VII, and -X. The unconventional myosin-X (MyoX) is a potential candidate for VE-Cad transport since it is located at the filopodium tips of various nonendothelial cell lines (5).

Analysis of HUVEC lysates by Western blotting using anti-MyoX antibody revealed the presence of a 240-kDa band corresponding to full-length MyoX (Fig. 1 and 8A). Additional bands with molecular masses ranging from 100 to 130 kDa were also detected because of MyoX susceptibility to pro-

teolysis (6). Immunofluorescence labeling of subconfluent HUVECs effectively showed punctate staining of MyoX that partially colocalized with VE-Cad (Fig. 8B). After a careful scrutiny of immunofluorescence images, MyoX appeared associated with extrajunctional VE-Cad molecules and not with junctional VE-Cad molecules (Fig. 8B). We speculated that MyoX interacts, at least temporarily, with VE-Cad, thus allowing its cellular transport along intrafilopodial actin fibers. To verify this hypothesis, different approaches such as immunoprecipitation and pull-down assays were used. Hence, analyses of VE-Cad immunoprecipitates by Western blotting using an anti-MyoX antibody revealed the presence of the 240-kDa form of MyoX (Fig. 9A). Conversely, anti-MyoX immunoprecipitation showed association of MyoX with the uncleaved form of VE-Cad (Fig. 9B). To confirm immunoprecipitation data, GST pulldown assays were performed on HUVEC extracts using the FERM (band 4.1 protein, ezrin, radixin, and moesin) domain of MyoX previously described to be involved in cargo binding (28, 43) and N-terminally coupled to GST (GST-FERM). The GST-FERM fusion protein was first assayed for its capacity to bind integrin β -chains, as previously reported for MyoX (41). Pulldown assays, performed on HUVEC extracts, revealed that GST-FERM retained the capability to interact with the integrin β 1 chain, whereas GST did not (Fig. 9F). Importantly, GST-FERM specifically interacted with the uncleaved 135-kDa form of VE-Cad and not with the intracellular truncated 100-kDa form present in HUVEC lysates (Fig. 9C). Moreover, GST-FERM was able to pull down the VE-Cad cytoplasmic partners α - or β -catenins or p120 from HUVEC lysates (Fig. 9D). In contrast, it did not interact with a recombinant fragment that overlapped the amino stretch from A630 to Y784 corresponding to the cytoplasmic region of VE-Cad truncated at its N terminus (40; data not shown). This indicates that MyoX associates with one element of the VE-Cad-catenin complex without disturbing its integrity. In addition, actin, probably incorporated in filaments, was also coprecipitated with GST-FERM and not with GST (Fig. 9E). To exclude the possibility that actin filaments link the VE-Cad-catenin complex to MyoX, filaments were depolymerized in cell extracts with the actin monomer-sequestering drug latrunculin B (LaB) (13). Under these conditions, no actin was precipitated in GST-FERM pulldown assays (Fig. 9E). However, VE-Cad was still pulled down with GST-FERM, indicating that actin cables were not involved in the link between the VE-Cad-catenin complex and MyoX. Finally, substitution in pulldown assays of the FERM domain of MyoX by the FERM domain of moesin did not precipitate VE-Cad, attesting that the results obtained with the FERM domain of MyoX are specific (data not shown). Altogether, our results establish that the FERM domain of MyoX interacts with the VE-Cad-catenin complex.

MyoX transports VE-Cad along filopodia. To examine the temporal and spatial colocalization of VE-Cad and MyoX, VE-DSR and MyoX N-terminally fused with GFP (GFP-MyoX [6]) were coexpressed in HUVECs. We first controlled the specificity of the localization of VE-DSR and GFP-MyoX prior to imaging (Fig. 3). Using video microscopy, we noticed that some patches of GFP-MyoX remained immobile at filopodium tips, while others started from the tips of filopodia dragging VE-DSR clusters backwards (Fig. 10; see Movie S5 in

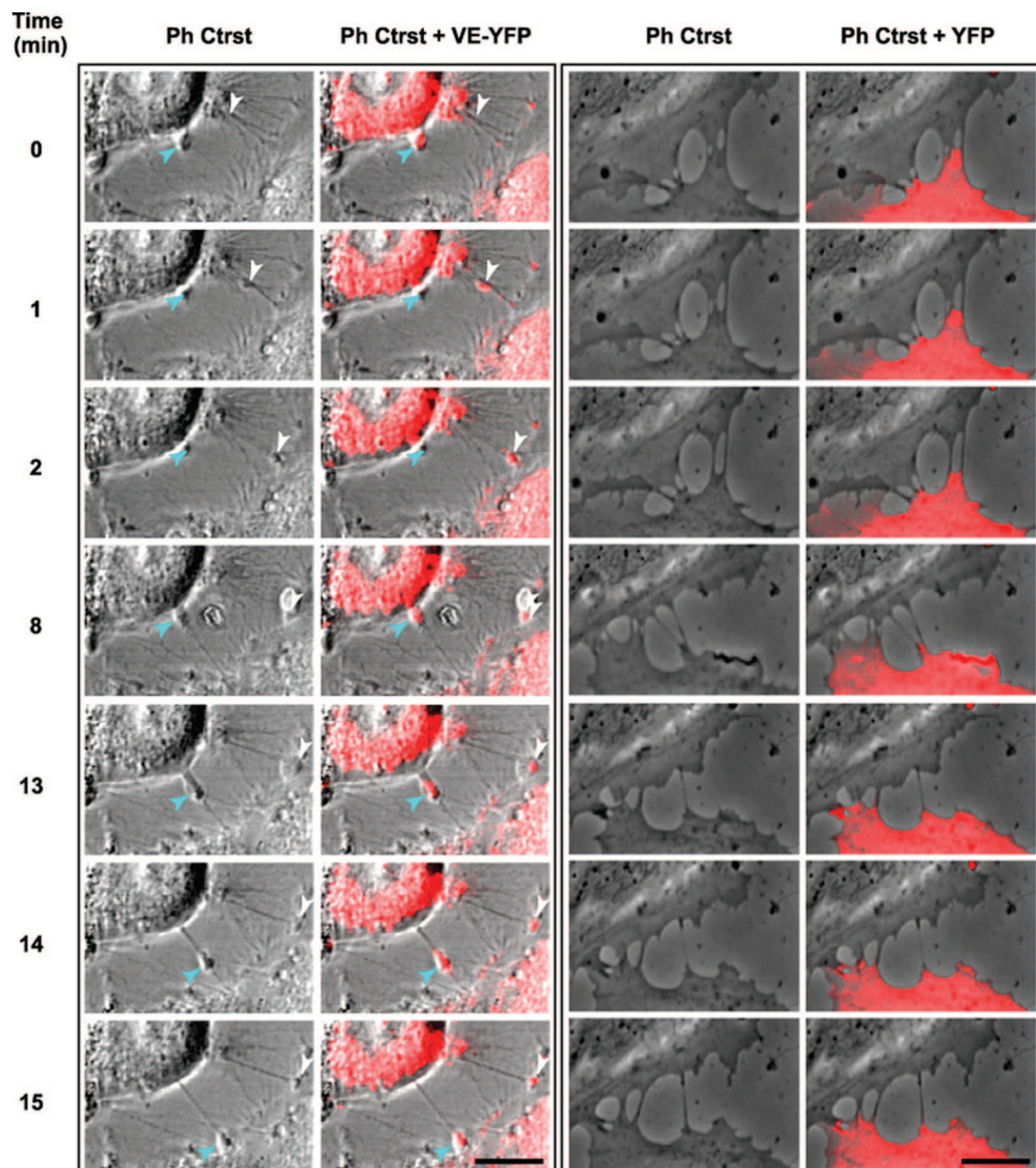


FIG. 7. Selected sequences showing VE-YFP moving along filopodia. Subconfluent HUVECs were transiently transfected with the plasmids expressing either VE-YFP or YFP. At 17 h posttransfection time, confocal video microscopy images were taken every min for 1 h both in phase-contrast (Ph Ctrst) to see the filopodia and in the yellow fluorescence channel. Panels corresponding to VE-YFP-expressing HUVECs (left) showed two distinct patches, indicated by arrowheads, moving sequentially along two filopodia (see Movie S1 in the supplemental material). In contrast, no YFP was detected along filopodia, as illustrated in panels corresponding to YFP-expressing HUVECs (right) (see Movie S2 in the supplemental material). Bars, 10 μ m.

the supplemental material). This backward movement was relatively slow and could be observed by video microscopy using a frame rate of 1 image/3 s. In addition, movements of VE-DSR and MyoX patches toward the tips of filopodia (forward motion) were also observed. However, the high displacement rate at 37°C in HUVECs rendered the observation of these movements difficult. To palliate this inconvenience, we chose to image VE-DSR and GFP-MyoX motilities in HeLa cells. These experiments were performed at 25°C to reduce the movement rate (21) since HeLa cells, in contrast to HUVECs,

tolerate this temperature. Under these selected conditions, HeLa exhibited 10- to 20- μ m-long filopodia, and it was possible to individually track VE-DSR and GFP-MyoX patches over times ranging from 50 to 100 s (see Movies S6 and S7 in the supplemental material). Hence, Movie S7 shows a single patch of GFP-MyoX that colocalized with a single VE-DSR patch and moved synchronously with it on a given filopodium. Both patches moved backwards prior to moving toward the distal tip of the filopodium (full arrowheads). It could be noticed that the backward movement was frequently interrupted

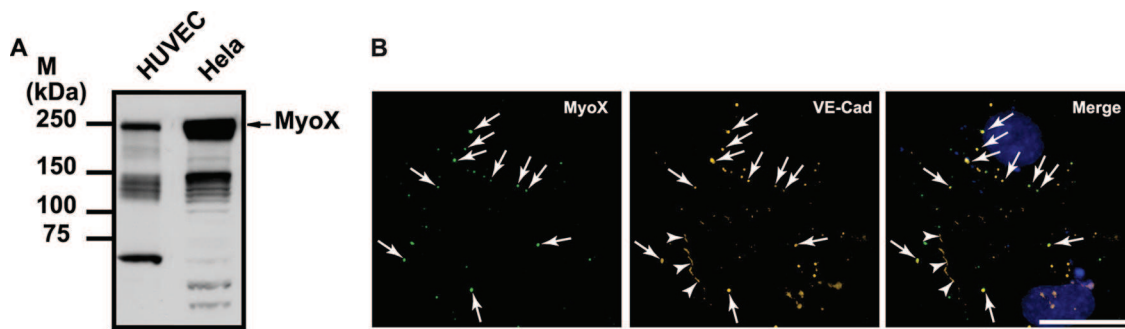


FIG. 8. Expression of MyoX in HUVECs and HeLa cells. (A) Detection of endogenous MyoX by Western blotting. HUVEC and HeLa cell lysates were analyzed by Western blotting using the anti-MyoX pAb antibody. In HUVECs as well in HeLa cells, the antibody detected a 240-kDa band corresponding to the expected size of MyoX and several bands of lower molecular mass corresponding to MyoX degradation (6). Larger amounts of MyoX were detected in HeLa cells compared to HUVECs. (B) Partial colocalization of endogenous MyoX and VE-Cad along filopodia in subconfluent HUVECs. Subconfluent HUVECs were double labeled for MyoX (left) and VE-Cad (center) with anti-MyoX pAb, anti-VE-Cad MAb BV9, and Alexa 555-labeled goat anti-rabbit and Alexa 488-labeled goat anti-mouse antibodies and Hoechst stain. The merged image is at the right. Arrows point out VE-Cad patches colocalized with MyoX, while arrowheads indicate cell-cell junctions where VE-Cad and MyoX did not colocalize. Bar, 20 μ m.

by episodes of pausing (see Movie S7 in the supplemental material). Movie S7 also highlights the difference existing between forward and backward velocities. Altogether, our results on MyoX and VE-Cad colocalization and comigration along filopodia strongly suggest that VE-Cad is transported by a MyoX-dependent mechanism.

Frequently, VE-DSR/GFP-MyoX patches moving forward and backward were individually observed on the same filopodium. To obtain a global vision of protein movements along a given filopodium, the location of each patch was plotted versus time to generate a kymograph. In this kind of projection, each patch movement appears as an individual line directed toward the tip of filopodium for forward movement and toward the filopodium base for backward movement (Fig. 4). The velocity of a large number of individual patches visualized by single-channel video microscopy could be derived from the slope of the tracks in kymographs and reported in histograms showing the velocity profile for each fusion protein (Fig. 11). Hence, we calculated that VE-DSR moved at an average forward rate of 694 ± 174 nm s⁻¹ (115 measurements on 35 filopodia) (Fig. 11A) and at an average backward rate of 27 ± 10 nm s⁻¹ (38 measurements on 22 filopodia) (Fig. 11C). Similarly, GFP-MyoX kymographs showed that GFP-MyoX moved forward at an average velocity of 649 ± 218 nm s⁻¹ (129 measurements on 15 filopodia) (Fig. 11B) and backwards at 25 ± 10 nm s⁻¹ (41 measurements on 22 filopodia) (Fig. 11D), as previously described (21). Statistically, according to the two-sample *t* test, the mean rates for the forward movements of VE-DSR and GFP-MyoX are equivalent ($P > 0.05$).

Double-channel video microscopy experiments were also performed on HeLa cells coexpressing GFP-MyoX and VE-DSR to visualize the synchronous movements of the two fluorescent proteins. Hence, in Fig. 12A and B, dual kymographs showed two selected GFP-MyoX and VE-DSR particles that exhibited synchronous backward (pointed out by arrowheads) and forward (pointed out by arrows) motions. These experiments confirm the cotransport of GFP-MyoX and VE-DSR along filopodia in both directions. Because of the known functions of MyoX as a cargo for protein transport and as an actin

motor protein, it is likely that MyoX mediates the transportation of the VE-Cad complex along intrafilopodial actin cables.

MyoX FERM domain overexpression blocks the transportation of VE-CFP. We next tried to test the functional role of MyoX-mediated transport of VE-Cad. We opted for a dominant-negative approach by constructing the fusion GST-FERM-DSR protein consisting of the GST moiety, the FERM domain of MyoX, and DSR (Fig. 13A). This fluorescent protein was designed to retain the cargo function but to remove the motor function of MyoX. The fusion protein GST-DSR, composed of the GST and the DSR entities, was also elaborated and used as a control (Fig. 13A). The cDNA constructs coding for GST-FERM-DSR and GST-FERM were transiently transfected in CHO cells, and the expression of recombinant proteins was analyzed by Western blotting using the polyclonal anti-GST antibody. As expected, a 110-kDa band and an 80-kDa band were detected in the GST-FERM-DSR and GST-DSR transfectants, respectively (Fig. 13B). Moreover, GST-FERM-DSR interacted with VE-Cad, as attested by immunoprecipitation experiments performed on CHO cells coexpressing VE-Cad and GST-FERM-DSR. In contrast, GST-DSR did not (Fig. 13C).

To prove that VE-Cad sequestration by GST-FERM-DSR is specific, we cotransfected VE-Cad-expressing CHO cells with plasmids coding for GFP-MyoX and either GST-DSR or GST-FERM-DSR. Anti-MyoX immunoprecipitations on cell lysates revealed that the amount of VE-cadherin coprecipitated with MyoX remained nearly unchanged in the presence or absence of GST-DSR (Fig. 13D). In contrast, a slight and reproducible decrease in the amount of VE-Cad immunoprecipitated with MyoX was observed in the presence of GST-FERM-DSR, suggesting that GST-FERM-DSR competes with MyoX for interaction with VE-Cad.

Then, the cellular effect due to VE-Cad sequestration by the FERM domain of MyoX was analyzed in HUVECs coexpressing VE-CFP and GST-FERM-DSR. In double-transfected cells, VE-CFP remained static, concentrated at the periphery of the nucleus, whereas in the absence of GST-FERM-DSR, VE-CFP appeared highly mobile, disseminated

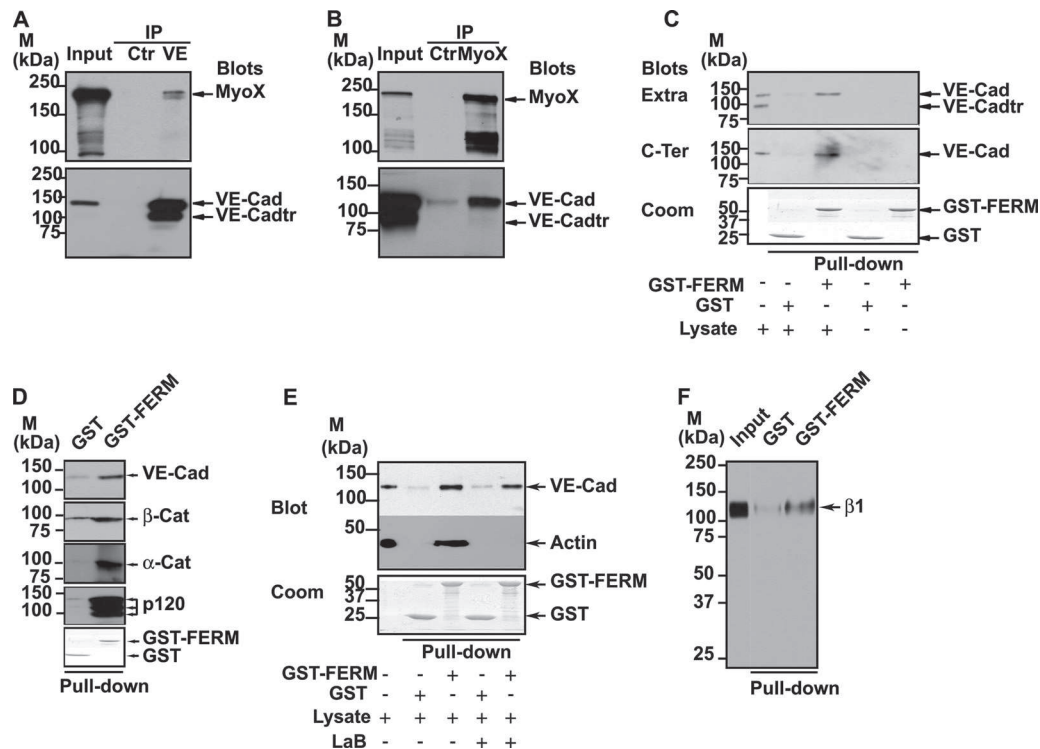


FIG. 9. Association of MyoX to the VE-Cad-based complex. (A and B) Coimmunoprecipitations of endogenous MyoX with endogenous VE-Cad in HUVECs. Anti-VE-Cad (IP VE; A) and anti-MyoX (IP MyoX; B) immunoprecipitations were resolved on 4 to 12% gradient gels, electrotransferred and probed successively for VE-Cad and MyoX. As controls, an aliquot of whole-cell lysate (input) and immunoprecipitations performed on HUVEC lysates using rabbit nonimmune IgG (Ctr) were analyzed in parallel. Note that anti-VE-Cad IP (A) and input analysis by Western blotting (B) revealed the presence of a 100-kDa truncated form of VE-Cad (VE-Cadtr). Molecular mass markers (M) are given at the margins of each panel. (C) Interaction of MyoX with the VE-Cad complex through its FERM domain. GST or GST-FERM immobilized on glutathione beads was incubated with either HUVEC lysates or with buffer. Pulldown assays were revealed with the anti-VE-Cad antibodies directed against the extracellular domain (Extra; MAb BV9) or the cytoplasmic domain (C-Ter; pAb C-19). (Lower panel) Coomassie (Coom) staining of GST proteins used in each pulldown assay. For comparison, aliquots of whole-cell lysates and pulldown assay controls performed without lysate were analyzed in parallel. Note that the antibody C-19 raised against the 19-amino-acid C-terminal peptide of VE-Cad did not recognize VE-Cadtr, indicating that the truncated form of VE-Cad is cleaved at its C terminus. Only the uncleaved form of VE-Cad is coprecipitated with the FERM domain of MyoX. (D) Coprecipitation of catenins with VE-Cad by the FERM domain of MyoX. GST and GST-FERM pulldown assays performed on HUVEC lysates were probed with VE-Cad, α -catenin (α -cat), β -catenin (β -cat), and p120 antibodies. All of these proteins were detected in pulldown assays performed with GST-FERM but not with GST alone. (E) The interaction between the VE-Cad complex and MyoX does not require actin fibers. GST and GST-FERM pulldown assays performed on HUVEC lysates treated (+) or not (–) with latrunculin B (LaB) were sequentially immunoblotted for VE-Cad with C-19 pAb and for β -actin with anti- β -actin MAb. For comparison, an aliquot of whole-cell lysate was analyzed in parallel. (Lower panel) Coomassie staining of GST proteins. In pulldown assays, VE-Cad was precipitated with the domain FERM of MyoX, even in the absence of actin. (F) The recombinant GST-FERM protein interacts with the β 1 chain of integrins. GST and GST-FERM pulldown assays performed on HUVEC lysates were immunoblotted for the β 1 chain of integrins with the pAb anti- β 1 integrin antibody. For comparison, an aliquot of whole-cell lysate (input) was analyzed in parallel. In pulldown assays, the β 1 chain of integrins was precipitated with the domain FERM of MyoX.

over the cell surface and at cell-cell junctions (Fig. 14A; see Movie S8 in the supplemental material). We also demonstrated that GST-FERM-DSR concentrates endogenous VE-Cad in the perinuclear area, while GST-DSR did not (data not shown). It can be deduced that, by competing with endogenous MyoX, GST-FERM-DSR could block the transportation of endogenous and exogenous VE-Cad along actin fibers. The absence of transport resulted in an almost total VE-Cad depletion at cell edges (Fig. 14A). Furthermore, cell-cell contacts between GST-FERM-DSR-expressing cells did not stabilize, in spite of the membrane apposition between neighboring cells (Fig. 14B; see Movie S9 in the supplemental material). Numerous intercellular gaps appeared and spaces between opposed cells increased with time. Hence, blockage of MyoX-mediated VE-Cad traffic prevents the adhesion between cell

fronts and formation of early cell-cell contacts required for the elaboration of interendothelial junctions.

MyoX/VE-Cad cotraveling operates during wound healing.

To obtain additional information about the cellular role of MyoX/VE-Cad cotrafficking, we performed *in vitro* wound-healing assays on GFP-MyoX- and VE-Cad-DSR- overexpressing HUVEC monolayers and followed the early steps of cell-cell junction reconstruction by phase-contrast and fluorescence video microscopy (see Movie S10 in the supplemental material). Movie S10 focused on two noninteracting cells, both coexpressing VE-DSR and GFP-MyoX. These cells emitted very dynamic filopodia. Clearly, several of them operated cooperatively in a confined area to constitute the first cell-cell contacts. At this specific point, it could be observed that VE-Cad accumulated at the filopodium tips, elaborating homophilic interactions as

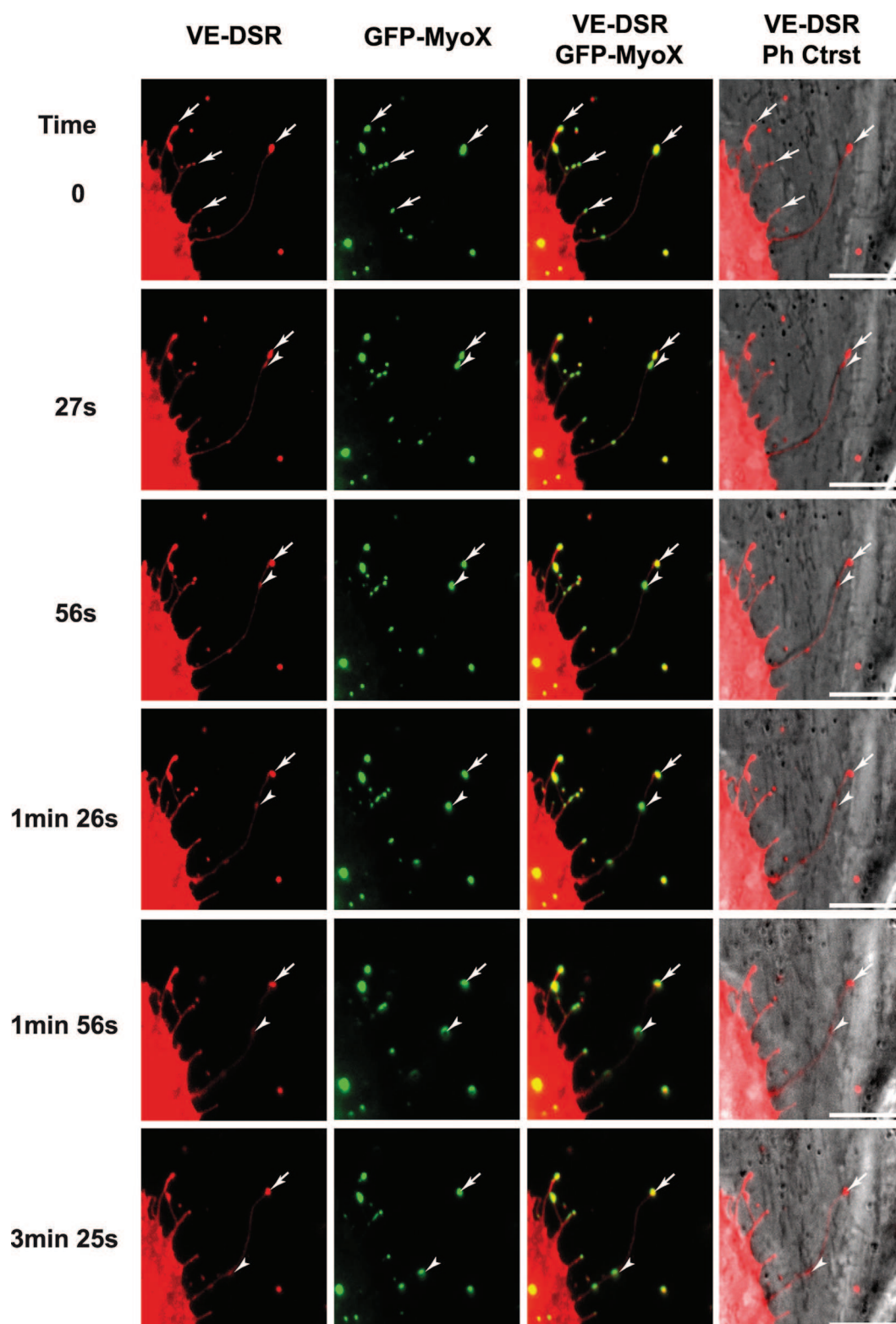


FIG. 10. Selected sequence focusing on the coordinated backward movements of MyoX and VE-Cad. Subconfluent HUVECs, transiently cotransfected with plasmids expressing GFP-MyoX and VE-DSR, were observed by video microscopy at 17 h posttransfection at a frame rate of 1 image/3 s. Full arrowheads and arrows indicate moving and immobile patches, respectively, for VE-Cad and MyoX. Bars, 10 μ m.

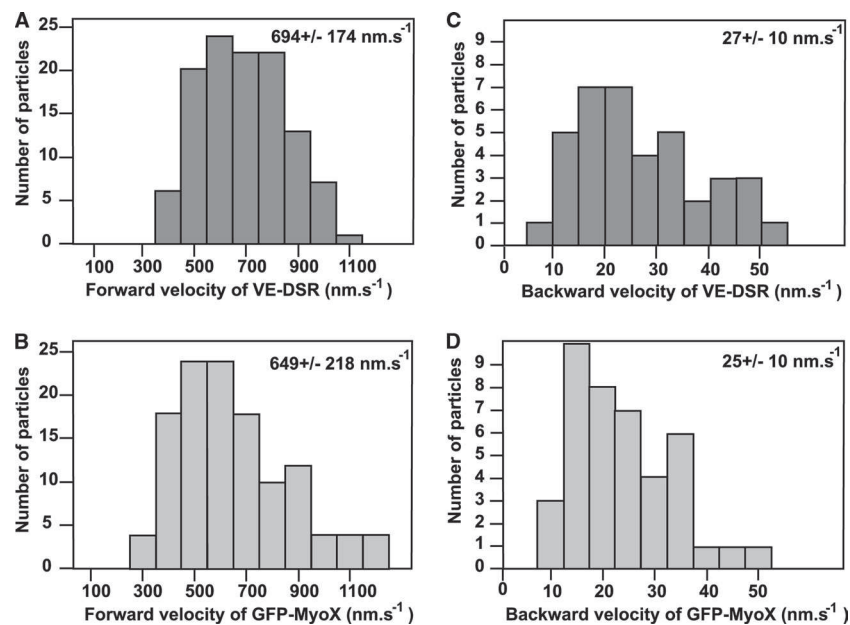


FIG. 11. Velocity histograms for forward and backward movements of VE-DSR and GFP-MyoX patches. Histograms corresponding to the forward movements of VE-DSR (A) and GFP-MyoX (B) patches were generated from 115 and 129 measurements, respectively, while those corresponding to the backward movements of VE-DSR (C) and GFP-MyoX (D) patches were generated from 38 and 41 measurements, respectively. At the top right, the means \pm standard deviations are indicated. HeLa cells were imaged at 25°C using a $\times 40$ lens (NA, 1.35), a pixel size of 162 nm, and a frame rate ranging from 3 to 5 images s^{-1} .

soon as filopodia touched the neighboring cell. These very unstable preliminary cell-cell contacts initiated the formation of filopodium-based bridges between the adjacent cells. VE-cadherin-based contacts progressively distributed along the

cell edges. The multiplicity of the contact points contributed to cell-cell tightening and to the reduction of the intercellular spaces, leading to a stabilization of the cell-cell junction. In conclusion, these data underlined the role played by MyoX-mediated accumulation of VE-Cad at the tips of filopodia in the elaboration of preliminary endothelial cell-cell contacts, which further progress into wound closure.

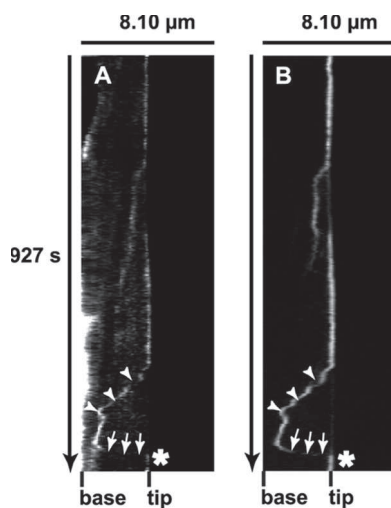


FIG. 12. MyoX and VE-Cad dynamics in living HeLa cells. Shown are synchronous kymographs of a selected filopodium emanating from HeLa cells coexpressing VE-DSR (A) and GFP-MyoX (B) imaged at 25°C using a $\times 40$ lens (NA, 1.35), a pixel size of 162 nm, and a frame rate of 3 images/10 s. The VE-DSR kymograph showed a patch that (i) remained stationary (vertical track), (ii) globally moved backward toward the filopodium base (arrowheads), (iii) abruptly changed direction, and (iv) moved forward (arrows) prior to reaching the filopodium tip. Note that the backward phase was frequently interrupted by pausing events, thus creating a stair-shaped track (arrowheads). This track was perfectly detected in the corresponding GFP-MyoX kymograph illustrating the synchronous movement of VE-DSR and GFP-MyoX patches on a given filopodium.

DISCUSSION

In the present article, we show how the actin cytoskeleton supports VE-Cad transport along filopodia to eventually elaborate primary cell-cell contacts. Indeed, we observed the to-and-fro movements of VE-Cad patches along filopodia and established that this traffic is governed by the motor protein MyoX. A model recapitulating VE-Cad movement modes is proposed in Fig. 15.

Herein, we observed by immunofluorescent staining (Fig. 5) and cryo-electron microscopy (Fig. 6) that VE-Cad is located along filopodia emanating from sparse endothelial cells or forming bridges between neighboring cells. This contrasts with the usual localization of VE-Cad at cell-cell junctions in confluent endothelial monolayers. By video microscopy, we uncovered that VE-Cad navigates along these filopodia (see Movies S1, S3, S5, and S6 in the supplemental material) and suspected that a motor protein of the myosin family might be involved in this traffic. Among myosin proteins, myosin-X was a potential candidate for governing VE-Cad motions.

This unconventional motor protein is widely expressed in a variety of vertebrate tissues in particular in vascularized ones such as lung, heart, and placenta (6). Consistent with this observation, MyoX was recently found in the endothelium where it is involved in cell migration guidance (28). In different

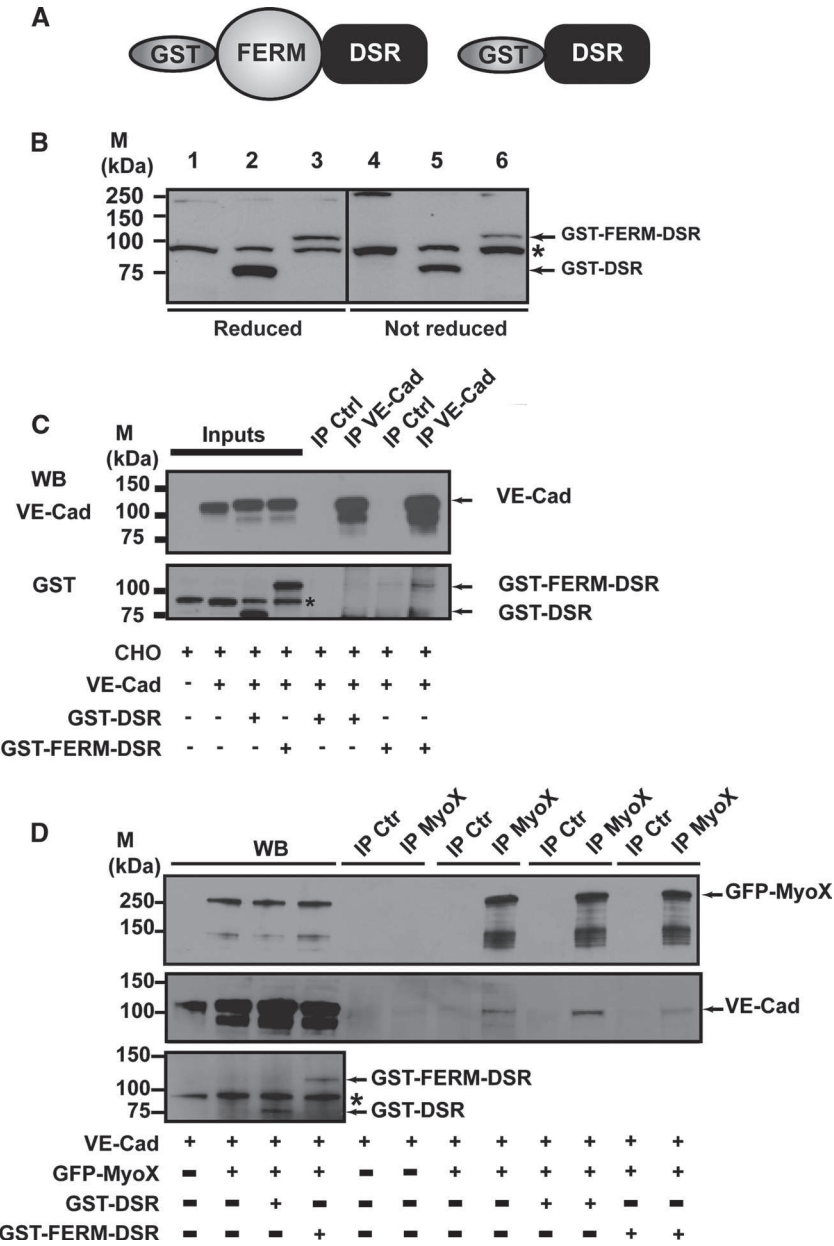


FIG. 13. Biochemical characterization of the recombinant proteins GST-FERM-DSR and GST-DSR. (A) Schematic representation of MyoX and its derived fragments. The recombinant fragment GST-FERM-DSR was designated to keep the capacity of MyoX to interact with VE-Cad via its FERM domain. The GST-DSR recombinant fragment was used as a control. (B) Expression of GST-DSR and GST-FERM-DSR. CHO cells were transfected with either GST-DSR (lanes 2 and 5) or GST-FERM-DSR (lanes 3 and 6) or not (lanes 1 and 4). Expression of GST-DSR and GST-FERM-DSR in CHO cells was verified by Western blotting (WB) using the anti-GST antibody. This antibody recognized an 80-kDa band and a 110-kDa band corresponding to GST-DSR and GST-FERM-DSR, respectively. Additionally, it also unspecifically recognized a protein present in CHO lysates (asterisk). (C) GST-FERM-DSR interacts with VE-cadherin. Anti-VE-Cad immunoprecipitations (IP VE-Cad) were performed on CHO cell lysates coexpressing either VE-Cad and GST-FERM-DSR or VE-Cad and GST-DSR using the Mab anti-VE-Cad BV9. As controls, aliquots of whole CHO lysates (inputs) and immunoprecipitations performed on CHO lysates using mouse nonimmune IgG (IP Ctrl) were analyzed in parallel. A 110-kDa band corresponding to GST-FERM-DSR was detected in the anti-VE-Cad immunoprecipitate, indicating that GST-FERM-DSR is able to interact with VE-Cad. The anti-GST antibody recognized, as in panel B, GST-DSR and GST-FERM-DSR, as well as an unspecific protein present in CHO cell lysates (asterisk). (D) Cellular VE-Cad sequestration by the MyoX FERM domain. VE-Cad-expressing CHO cells (40) were transiently transfected with plasmids coding for GFP-MyoX and either GST-DSR or GST-FERM-DSR. After cell lysis, anti-MyoX immunoprecipitations were resolved on 4 to 12% gradient gels, electrotransferred, and probed successively for VE-Cad, MyoX, and GST. As controls, aliquots of the various CHO lysates and immunoprecipitations performed using rabbit nonimmune IgG (IP Ctr) were analyzed in parallel. Molecular markers (M) are given at the left (B to D).

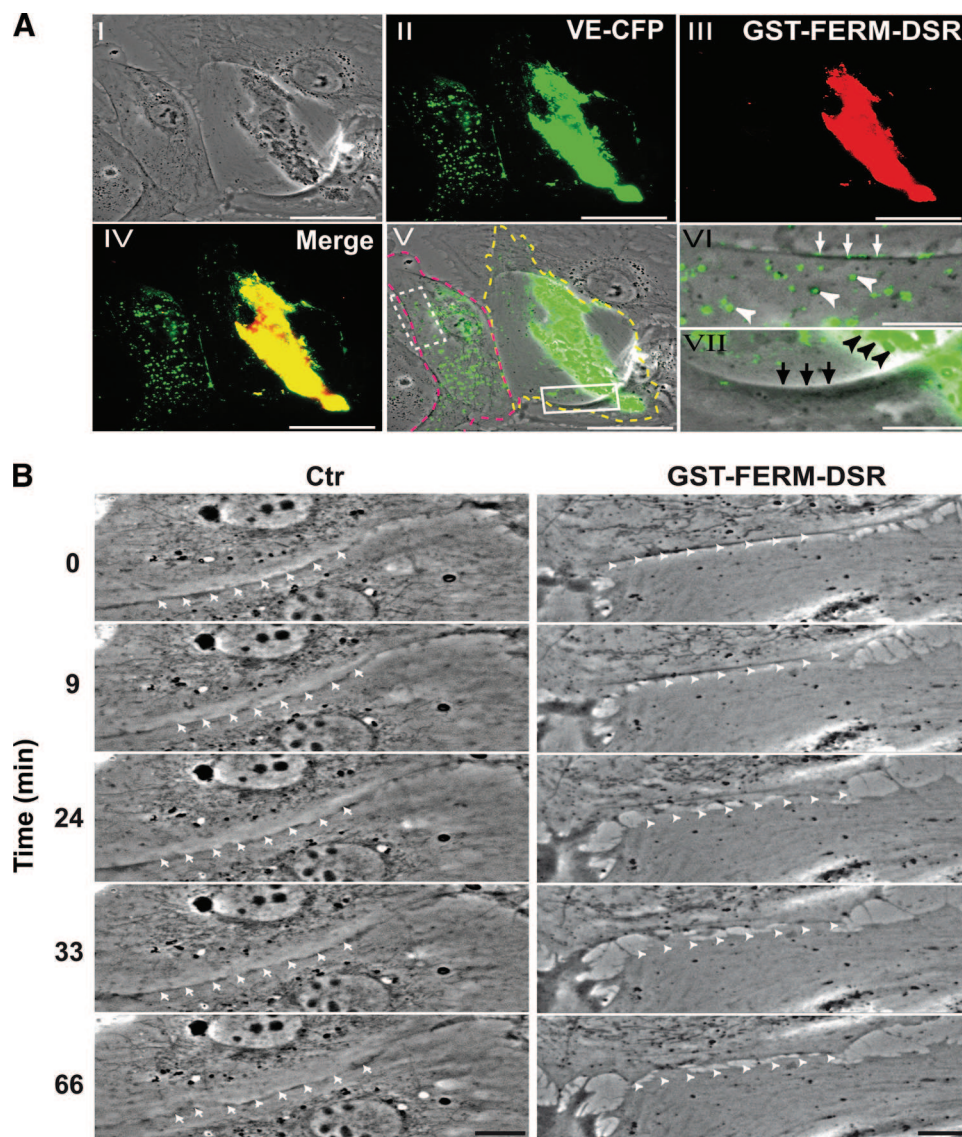


FIG. 14. Functional role of MyoX-mediated transport of VE-Cad. (A) Blockage of VE-CFP transport by GST-FERM-DSR expression. Subconfluent HUVECs transiently cotransfected with plasmids expressing VE-CFP and GST-FERM-DSR were observed 20 h posttransfection in phase-contrast (I) and in the cyan and red fluorescence channels. VE-CFP (II; green), GST-FERM-DSR (III; red), VE-CFP and GST-FERM-DSR merging (IV), and VE-CFP and phase-contrast merging (V, VI, and VII) allowed the visualization of two adjacent differentially-transfected cells: the cell at the right (delimited by the yellow dotted line) coexpressed GST-FERM-DSR and VE-CFP, while the cell at the left (delimited by pink dotted line) only expressed VE-CFP. Other cells of the fields are untransfected. The selected enlargements show that VE-CFP patches are at the cell-cell junctions (white arrows) and dispersed at the cell surface (white arrowheads) in the monotransfected cell (VI; dotted rectangle in V), whereas in the double-transfected cell, VE-CFP and GST-FERM-DSR colocalized and gathered around the cell nucleus (black arrowheads, VII; rectangle, V), indicating that GST-FERM-DSR blocked the VE-Cad transport to the cell edge. In control experiments, in cells coexpressing GST-DSR and VE-CFP, VE-CFP patches are located at cell-cell junctions (data not shown). Bars, 40 μm (I to V) and 10 μm (VI and VII). (B) Blockage of intercellular contact formation by GST-FERM-DSR expression. The sequences are selected from Movie S9 in the supplemental material and focus on the edges of two adjacent cells. In the right column, the cell below expressed GST-FERM-DSR, while the cell at the top is untransfected. In the left column, both cells expressed GST-DSR. Arrowheads show unstable junctions, whereas arrows point out stable junctions. Bars, 10 μm .

cell types, it is detected along the leading edge of lamellipodia (33) but, more frequently, at the tips of filopodia. In fact, MyoX is probably involved in the initiation of filopodium formation (9, 37). It moves along filopodial actin cables by an ATP-dependent walking mechanism toward the filament barbed ends, but also toward the cell body using the actin retrograde flow (5, 6, 26). MyoX possesses a FERM domain

known to interact with the β -chains of integrins (43). Herein, we show that MyoX associates, via its FERM domain, with the VE-Cad-catenin complex (Fig. 9). This novel result underlines the versatility of MyoX FERM domain for interacting with different adhesive receptors.

We visualized the synchronous transit of MyoX and VE-Cad to or from the tips of filopodia. The forward movement that

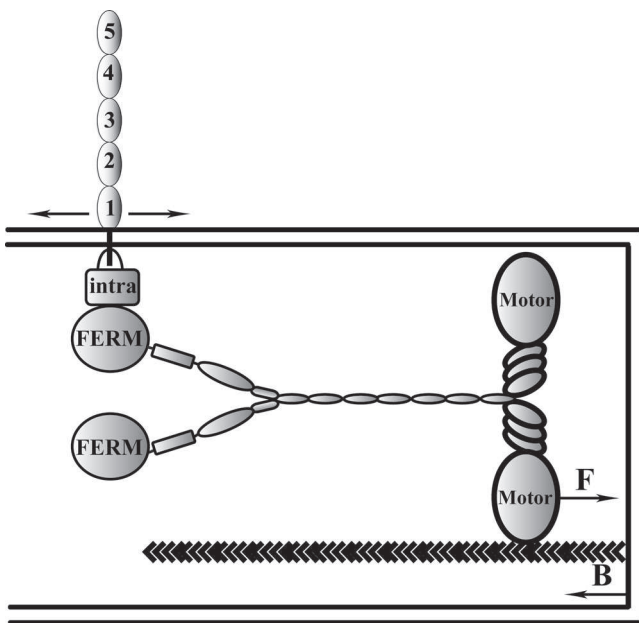


FIG. 15. Schematic model illustrating the movements of VE-Cad along filopodia (43). MyoX binds to actin filaments via its motor domain and to the VE-Cad-catenin complex (intra) via its FERM domain. Consequently, VE-Cad moves forward (F) toward the filopodium tip at a rate ranging around 700 nm s^{-1} and backwards (B) at a rate ranging around 30 nm s^{-1} .

reflects the barbed-end-directed movement of MyoX occurs at an average velocity of 700 nm s^{-1} (Fig. 11), a value similar to that reported in the literature (21). This is also consistent with the 500 nm s^{-1} rate of the recombinant MyoX head moving on actin filaments *in vitro* (20). This similitude between *in vivo* and *in vitro* velocities indicates that the rate of MyoX motion is not affected by the transport of cargoes as heavy as the VE-Cad-catenin complex. The backward movement exhibits a mean rate of 27 nm s^{-1} and allows the redistribution of VE-Cad at the cell body membrane. This motion is probably coupled to the continuous actin retrograde flow that causes the net transport of actin molecules within filaments from the plus end at the tip of a filopodium toward the minus end at the cell body. The speed of VE-Cad retrograde movement matches the speed for actin retrograde flow that is approximately 33 nm s^{-1} (32). Moreover, it could be noticed that the forward and backward movements are frequently interrupted by pausing events. They can be interpreted as the detaching of MyoX from actin cables or as the transient harpooning of either MyoX or its VE-Cad cargo by proteins in their close vicinity.

In Movie S10, we showed that cells sound their environment by emitting filopodia that propel VE-Cad molecules against neighboring cells. At these contact sites, VE-Cad elaborates homophilic interactions with VE-Cad partner molecules present in the counter membranes to constitute the first cell-cell anchor points. Subsequently, intercellular bridges between adjoining cells form and additional VE-Cad molecules transit on them prior to be engaged in their turn in homophilic interactions. VE-Cad accumulation thus reinforces the strength of these preliminary contacts.

VE-Cad molecules on their way back to the cell edges may

be picked up again by other growing filopodia. These to-and-fro movements may adjust the local concentration of VE-Cad to the cell's needs in specific sites where cell-cell contacts are constructed or remodeled. Moreover, blockage of MyoX-mediated transport by a dominant-negative approach prevents the transportation of VE-Cad at the plasma membrane and subsequently inhibits formation of endothelial cell-cell contacts (Fig. 14A and B).

Once engaged in homophilic interactions, we frequently observed that VE-Cad moved along cortical actin fibers, thus assisting the lateral extension of cell-cell contacts (data not shown). At these more mature adhesion cell-cell contact sites, no colocalization of MyoX and VE-Cad was detected, suggesting that this motor protein is an effective partner for VE-Cad within filopodia but not in mature junctions (Fig. 8). This probably reflects the heterogeneity existing between the actin filaments inserted into filopodia and those decorating cell-cell junctions that form, in endothelial cells, a continuous thin belt (Fig. 5). This feature is in agreement with the existence of regiospecific actin filament populations on which some myosins are recruited and other ones excluded (10).

MyoX-mediated accumulation of VE-Cad at filopodium tips is an important event probably involved in the restoration of endothelial monolayer integrity or in reclosure of wounds (see Movie S10 in the supplemental material). The multiplicity of cell-cell contacts created by filopodia that form bridges between adjacent cells seems to participate in the stabilization of nascent cell-cell junctions.

In conclusion, we have shown here that MyoX transports VE-Cad, an endothelium-specific cadherin to the tips of filopodia to promote homotypic cell-cell junction formation. A major goal for the future will be to examine whether this MyoX-supported transport of VE-Cad participates in the endothelium remodeling *in vivo*, in pathophysiological situations including endothelium repair or angiogenesis. In addition, it will be interesting to determine whether the concept of myosin-mediated transport of cadherins can be extended to tissues expressing other members of the cadherin family.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the staff of the maternity ward from Hôpital Nord (Grenoble, France) for kindly collecting umbilical cords. The optical microscopy-cell imaging platform and the Institute Albert Bonniot are acknowledged for granting access to the confocal microscopy facilities and help with image acquisition and analysis. We thank R. E. Cheney for GFP-myoxin-X, R.-M. Mège, and R. Y. Tsien for DSRcdNA constructs and L. Blanchoin for helpful discussions.

This work was supported by the Ligue Régionale de Savoie Contre le Cancer, the Agence Nationale de la Recherche (ANR, PCV), and the Association pour la Recherche sur le Cancer (grants 4447 and 3775). S.A. was a recipient of fellowships from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) and the Agence Nationale de Recherche. A.C.-P., S.H., and M.D. are recipients of fellowships from the CEA, the Association de Recherche sur la Polyarthrite, and the Agence Nationale de Recherche (ANR-06-PCV), respectively.

REFERENCES

1. Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**:3797–3804.
2. Adams, C. L., Y. T. Chen, S. J. Smith, and W. J. Nelson. 1998. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* **142**:1105–1119.

3. Adams, C. L., W. J. Nelson, and S. J. Smith. 1996. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **135**:1899–1911.
4. Bear, J. E., and F. B. Gertler. 2009. Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J. Cell Sci.* **122**:1947–1953.
5. Berg, J. S., and R. E. Cheney. 2002. Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nat. Cell Biol.* **4**:246–250.
6. Berg, J. S., B. H. Derfler, C. M. Pennisi, D. P. Corey, and R. E. Cheney. 2000. Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *J. Cell Sci.* **113**:3439–3451.
7. Block, J., T. E. Stradal, J. Hanisch, R. Geffers, S. A. Kostler, E. Urban, J. V. Small, K. Rottner, and J. Faix. 2008. Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *J. Microsc.* **231**:506–517.
8. Bogatcheva, N. V., and A. D. Verin. 2008. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. *Microvasc. Res.* **76**:202–207.
9. Bohil, A. B., B. W. Robertson, and R. E. Cheney. 2006. Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:12411–12416.
10. Brawley, C. M., and R. S. Rock. 2009. Unconventional myosin traffic in cells reveals a selective actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:9685–9690.
11. Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M. G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**:1229–1239.
12. Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:7877–7882.
13. Coue, M., S. L. Brenner, I. Spector, and E. D. Korn. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* **213**:316–318.
14. Erdbruegger, U., M. Haubitz, and A. Woywott. 2006. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin. Chim. Acta* **373**:17–26.
15. Faix, J., D. Breitsprecher, T. E. Stradal, and K. Rottner. 2009. Filopodia: complex models for simple rods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**:1656–1664.
16. Gulino, D., E. Delachanal, E. Concord, Y. Genoux, B. Morand, M. O. Valiron, E. Sulpice, R. Scaife, M. Alemany, and T. Vernet. 1998. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelial cadherin. *J. Biol. Chem.* **273**:29786–29793.
17. Gupton, S. L., and F. B. Gertler. 2007. Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci. STKE* **2007**:re5.
18. Hermant, B., S. Bibert, E. Concord, B. Dublet, M. Weidenhaupt, T. Vernet, and D. Gulino-Debrac. 2003. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelial cadherin during neutrophil transmigration. *J. Biol. Chem.* **278**:14002–14012.
19. Heyraud, S., M. Jaquinod, C. Durmort, E. Dambroise, E. Concord, J. P. Schaal, P. Huber, and D. Gulino-Debrac. 2008. Contribution of annexin 2 to the architecture of mature endothelial adherens junctions. *Mol. Cell. Biol.* **28**:1657–1668.
20. Homma, K., J. Saito, R. Ikebe, and M. Ikebe. 2001. Motor function and regulation of myosin X. *J. Biol. Chem.* **276**:34348–34354.
21. Kerber, M. L., D. T. Jacobs, L. Campagnola, B. D. Dunn, T. Yin, A. D. Sousa, O. A. Quintero, and R. E. Cheney. 2009. A novel form of motility in filopodia revealed by imaging myosin-X at the single-molecule level. *Curr. Biol.* **19**:967–973.
22. Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco, and E. Dejana. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* **118**:1511–1522.
23. Maddugoda, M. P., M. S. Crampton, A. M. Shewan, and A. S. Yap. 2007. Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells. *J. Cell Biol.* **178**:529–540.
24. Mallavarapu, A., and T. Mitchison. 1999. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J. Cell Biol.* **146**:1097–1106.
25. Martel, V., L. Vignoud, S. Dupe, P. Frachet, M. R. Block, and C. Albiges-Rizo. 2000. Talin controls the exit of the integrin alpha 5 beta 1 from an early compartment of the secretory pathway. *J. Cell Sci.* **113**:1951–1961.
26. Mattila, P. K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:446–454.
27. Mege, R. M., J. Gavard, and M. Lambert. 2006. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:541–548.
28. Pi, X., R. Ren, R. Kelley, C. Zhang, M. Moser, A. B. Bohil, M. Divito, R. E. Cheney, and C. Patterson. 2007. Sequential roles for myosin-X in BMP6-dependent filopodial extension, migration, and activation of BMP receptors. *J. Cell Biol.* **179**:1569–1582.
29. Pollard, T. D. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**:451–477.
30. Raich, W. B., C. Agbunag, and J. Hardin. 1999. Rapid epithelial-sheet sealing in the *Caenorhabditis elegans* embryo requires cadherin-dependent filopodial priming. *Curr. Biol.* **9**:1139–1146.
31. Rudini, N., and E. Dejana. 2008. Adherens junctions. *Curr. Biol.* **18**:R1080–R1082.
32. Schelhaas, M., H. Ewers, M. L. Rajamaki, P. M. Day, J. T. Schiller, and A. Helenius. 2008. Human papillomavirus type 16 entry: retrograde cell surface transport along actin-rich protrusions. *PLoS Pathog.* **4**:e1000148.
33. Sousa, A. D., J. S. Berg, B. W. Robertson, R. B. Meeker, and R. E. Cheney. 2006. Myo10 in brain: developmental regulation, identification of a headless isoform and dynamics in neurons. *J. Cell Sci.* **119**:184–194.
34. Svitkina, T. M., E. A. Bulanova, O. Y. Chaga, D. M. Vignjevic, S. Kojima, J. M. Vasiliev, and G. G. Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.* **160**:409–421.
35. Tesfamariam, B., and A. F. DeFelice. 2007. Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. *Vasc. Pharmacol.* **46**:229–237.
36. Tokuo, H., and M. Ikebe. 2004. Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**:214–220.
37. Tokuo, H., K. Mabuchi, and M. Ikebe. 2007. The motor activity of myosin-X promotes actin fiber convergence at the cell periphery to initiate filopodia formation. *J. Cell Biol.* **179**:229–238.
38. Vasioukhin, V., C. Bauer, M. Yin, and E. Fuchs. 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**:209–219.
39. Vasioukhin, V., and E. Fuchs. 2001. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:76–84.
40. Wallez, Y., F. Cand, F. Cruzalegui, C. Wernstedt, S. Souchelnytskyi, I. Vilgrain, and P. Huber. 2007. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* **26**:1067–1077.
41. Waschke, J., F. E. Curry, R. H. Adamson, and D. Drenckhahn. 2005. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**:H1296–H1305.
42. Wood, W., and P. Martin. 2002. Structures in focus—filopodia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**:726–730.
43. Zhang, H., J. S. Berg, Z. Li, Y. Wang, P. Lang, A. D. Sousa, A. Bhaskar, R. E. Cheney, and S. Stromblad. 2004. Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **6**:523–531.